

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, A61K 38/17, G01N 33/50, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28024 (43) Date de publication internationale: 18 mai 2000 (18.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02738 (22) Date de dépôt international: 9 novembre 1999 (09.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/14146 10 novembre 1998 (10.11.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): HOECHST MARION ROUSSEL [FR/FR]; 1, terrasse Bellini, F-92800 Puteaux (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BORDON-PALLIER, Florence [FR/FR]; 37, boulevard Beethoven, F-78280 Guyancourt (FR). ROCHER, Corinne [FR/FR]; 3, rue Elisa Lemonnier, F-75012 Paris (FR). (74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean Claude; Hoechst Marion Roussel, 102, route de Noisy, F-93235 Romainville Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: htfIIIA HUMAN GENE AND CODED hTFIIIA PROTEIN (54) Titre: GENE HUMAIN htfIIIA ET LA PROTEINE CODEE hTFIIIA (57) Abstract <p>The invention concerns the gene coding for the human transcription factor called htfIIIA (or htfC2) gene and the coded hTFIIIA protein and the use of the htfIIIA gene and of the coded hTFIIIA protein for diagnosing and identifying certain diseases related to the transcription mechanism.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne le gène codant pour le facteur de transcription humain nommé gène htfIIIA (ou htfC2) et la protéine codée hTFIIIA ainsi que l'utilisation de ce gène htfIIIA et celui de la protéine codée hTFIIIA dans le diagnostic et l'identification de certaines maladies liées au mécanisme de la transcription.</p>		

09/831426
Translation
SDCO

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2503/PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02738	International filing date (day/month/year) 09 November 1999 (09.11.99)	Priority date (day/month/year) 10 November 1998 (10.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 May 2000 (23.05.00)	Date of completion of this report 21 February 2001 (21.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02738

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-26 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 1-16 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1/7-7/7 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02738

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	in full: 2-5, 11, 14; in part: 6, 10, 12-13, 15-16	YES
	Claims	in full: 1, 7-9; in part: 6, 10, 12-13, 15-16	NO
Inventive step (IS)	Claims	in full: 2-5, 11, 14; in part: 6, 10, 12-13, 15-16	YES
	Claims	in full: 1, 7-9; in part: 6, 10, 12-13, 15-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following document:

D1: EP-A-0 704 526 (OTSUKA PHARMA CO. LTD. (JP);
FUJIWARA T; TAKEDA S; SHIMADA Y; OZAKI K;
SHIN S), 3 April 1996 (1996-04-03).

2. Document D1, which is considered to be the most relevant prior art, discloses a (htfIIIA gene) DNA sequence of the gene coding for a protein having the biological function of the human transcription factor, hTFIIIA (D1: the abstract; pages 6 and 11-13). Said sequence has 99.5% nucleotide sequence homology, along the entire length thereof, to the sequences SEQ ID NO. 3 and SEQ ID NO. 4 of the present invention and includes modifications introduced by means of nucleotide suppression, insertion and substitution with respect to the aforementioned SEQ ID NO. 3 and SEQ ID NO. 4 (the "Bestfit" programme of the University of Wisconsin "Genetic Computer Group" has been used for all of the sequence homology analyses reported in the present report).

The DNA sequence of D1 codes for a protein having an

amino acid sequence with 96% homology, along the entire length thereof, to the sequence SEQ ID NO. 2 of the present invention. This protein is therefore an analogue of the polypeptide having the sequence SEQ ID NO. 2.

Document D1 describes an expression vector containing the aforementioned "htfIIIA gene" DNA sequence and a host cell transformed using said vector (D1: page 4 and Claims 5 and 7).

Moreover, document D1 describes the use of the hTFIIIA human transcription factor gene or the human transcription factor encoded by said gene in the preparation of compositions useful for diagnosing or treating diseases related to disorders in transcription control, particularly cancer (D1: page 4 and Claims 8 and 9).

It follows that, in light of the above, the subject matter of Claims 1, 6-10, 12, 13, 15 and 16 is not novel (PCT Article 33(2)) (Claim 6 is not novel in so far as it refers to Claim 1 or to the DNA sequences that have significant homology to the sequences SEQ ID NO.3 or SEQ ID NO. 4 of the present invention; Claim 10 is not novel with respect to the analogues of the polypeptide having SEQ ID NO. 2; Claims 12 and 13 are not novel in so far as they relate to a vector containing the DNA sequence as per one of Claims 6-9 and to a host cell transformed using said vector; Claims 15 and 16 are not novel in so far as they relate to the use of the transcription factor gene or the transcription factor encoded by said gene as per one of Claims 1 and 6-9, or to the analogues of the polypeptide

having the sequence SEQ ID NO. 2 as per Claim 10).

3. In comparison with the polypeptide sequence of D1, the subject matter of Claim 10 (the polypeptide having the sequence SEQ ID NO. 2 only) comprises some differences at the corresponding respective positions 105 and 163, 156 and 214, 320 to 329 and 378 to 387. Moreover, the hTFIIIA polypeptide of the present invention having the sequence SEQ ID NO. 2 begins at position 60 of the polypeptide sequence of D1.

The subject matter of Claim 2 differs from the DNA sequence of D1 in that the DNA sequence of D1 codes for a protein having the aforementioned sequence differences.

The subject matter of Claims 3-5 differs from the DNA sequence of D1 in that the DNA sequence of D1 includes modifications introduced by means of nucleotide suppression, insertion and substitution with respect to the nucleotide sequences SEQ ID NO. 3 and SEQ ID NO. 4.

It follows that the subject matter of Claims 2-6 (Claim 6: in so far as said claim refers to Claims 2-5), 10 (the polypeptide having the sequence SEQ ID NO. 2 only) is novel (PCT Article 33(2)).

- 4.1 In light of the aforementioned document D1, the problem which the present invention aims to solve can be considered to be that of providing an alternative protein having the biological function of the human transcription factor, hTFIIIA, corresponding materials (gene coding for said

protein, corresponding vector and host cell) and the use of said protein or corresponding gene.

- 4.2 The solution to this problem, as proposed in Claims 2-5 and 10 (Claim 10: the polypeptide having sequence SEQ ID NO. 2 only) of the present application, is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons: there is no indication in D1 that could be considered to suggest to a person skilled in the art to seek the existence of the protein having the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 or the corresponding gene.
5. Claims 11-16 also fulfil the requirements of the PCT concerning novelty (PCT Article 33(2)) and inventive step (PCT Article 33(3)), in so far as they relate to a method for preparing the hTFIIIA recombinant protein having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (Claim 11), to an expression vector containing the DNA sequence as per one of Claims 3 to 6 (Claim 12; concerning Claim 6: in so far as said claim refers to Claims 2-5), to a host cell transformed using said vector (Claim 13), to a plasmid containing the cDNA coding region of the hTFIIIA as per the present invention (Claim 14) and to the use in the preparation of compositions useful for diagnosing or treating diseases, involving the DNA sequences SEQ ID NO. 3 or SEQ ID NO. 4, or the protein having the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 (Claims 15 and 16).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

It is not indicated in Claims 8 and 9 whether the percentages of homology relate to the entire length of the sequences in question or to fragments.

It follows that the subject matter of Claims 8 and 9 is ambiguous and Claims 8 and 9 do not fulfil the requirements of PCT Article 6.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

BEST AVAILABLE COPY

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BEST AVAILABLE COPY

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude
Aventis Pharma S.A.
Département des Brevets
102, route de Noisy
F-93235 Romainville Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 30 janvier 2001 (30.01.01)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2503/PCT	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/02738	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 novembre 1999 (09.11.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne: <input checked="" type="checkbox"/> le déposant <input type="checkbox"/> l'inventeur <input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun		
Nom et adresse HOECHST MARION ROUSSEL 1, terrasse Bellini F-92800 Puteaux FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne: <input checked="" type="checkbox"/> la personne <input checked="" type="checkbox"/> le nom <input checked="" type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile		
Nom et adresse AVENTIS PHARMA S.A. 20 Avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone 01 55 71 71 71	
	no de télécopieur 01 47 02 50 14	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant: Ce changement de nom s'applique également à l'adresse du mandataire, comme indiqué dans le cadre destinataire ci-dessus.		
4. Une copie de cette notification a été envoyée: <input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur <input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés <input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale <input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés <input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international <input type="checkbox"/> autre destinataire:		

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Philippe Bécamel no de téléphone (41-22) 338.83.38
--	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

BEST AVAILABLE COPY

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 juin 2000 (13.06.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02738	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2503/PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 novembre 1999 (09.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 10 novembre 1998 (10.11.98)
Déposant BORDON-PALLIER, Florence etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

23 mai 2000 (23.05.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude
Aventis Pharma S.A.
Département des Brevets
102, route de Noisy
F-93235 Romainville Cedex
FRANCE

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 30 janvier 2001 (30.01.01)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2503/PCT	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/02738	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 novembre 1999 (09.11.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse

HOECHST MARION ROUSSEL
1, terrasse Bellini
F-92800 Puteaux
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

no de télécopieur

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☒ la personne ☒ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse

AVENTIS PHARMA S.A.
20 Avenue Raymond Aron
F-92160 Antony
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

FR

Domicile (nom de l'Etat)

FR

no de téléphone

01 55 71 71 71

no de télécopieur

01 47 02 50 14

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

Ce changement de nom s'applique également à l'adresse du mandataire, comme indiqué dans le cadre destinataire ci-dessus.

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Philippe Bécamel

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 21 FEB 2001

WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2503/PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02738	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 10/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 23/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 21.02.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tél. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Fonctionnaire autorisé Macchia, G N° de téléphone +31 70 340 4078 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02738

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-26 version initiale

Revendications, N°:

1-16 version initiale

Dessins, feuilles:

1/7-7/7 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-6, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02738

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffirable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n° :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	complètement: 2-5, 11, 14, partiellement: 6, 10, 12-13, 15-16
	Non :	Revendications	complètement: 1, 7-9; partiellement: 6, 10, 12-13, 15-16
Activité inventive	Oui :	Revendications	complètement: 2-5, 11, 14, partiellement: 6, 10, 12-13, 15-16
	Non :	Revendications	complètement: 1, 7-9; partiellement: 6, 10, 12-13, 15-16
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-16
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1). Il est fait référence au document suivant:

D1: EP-A-0 704 526 (OTSUKA PHARMA CO., LTD. (JP); FUJIWARA T.; TAKEDA S.; SHIMADA Y.; OZAKI K.; SHIN S.), 3 avril 1996 (1996-04-03).

2). Le document D1, qui est considéré comme représentant l'état de la technique le plus pertinent, divulgue une séquence d'ADN (gène htfIIIA) du gène codant pour une protéine ayant la fonction biologique du facteur de transcription humain hTFIIIA (D1: abrégé, pages 6 et 11-13). Cette séquence a une homologie de séquence nucléotidique de 99.5% avec les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 de la présente invention, sur toute la longueur, et comprend des modifications introduites par suppression, insertion et substitution de nucléotides par rapport aux susdites SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 (le program " Bestfit " de l'Université du Wisconsin " Genetic Computer Group " a été utilisé pour toutes les analyses d'homologie de séquence rapportées ici).

La séquence d'ADN de D1 code pour une protéine dont la séquence en acides aminés a une homologie de 96% avec la séquence SEQ ID N°2 de la présente invention, sur toute la longueur. Donc cette protéine est un analogue du polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2.

Le document D1 décrit un vecteur d'expression contenant la susdite séquence d'ADN " htfIIIA gène " et une cellule hôte transformée avec ledit vecteur (D1: page 4 et revendications 5 et 7).

En plus le document D1 décrit l'utilisation du gène du facteur de transcription humain htfIIIA ou du facteur de transcription humain codé par ce gène pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies liées à un désordre dans le contrôle de la transcription, notamment pour le cancer (D1: page 4 et revendications 8 et 9).

Au vu des mentions faites ci-dessus, l'objet des revendications 1, 6-10, 12, 13, 15 et 16 n'est donc pas nouveau (article 33(2) PCT; pour la revendication 6 dans la mesure où cette revendication se réfère à la revendication 1 ou aux séquences

d'ADN qui présentent des homologie significatives avec les séquences SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 de la présente invention; pour la revendication 10, en ce qui concerne les analogues du polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2; pour les revendications 12 et 13 dans la mesure où ces revendications se réfèrent à un vecteur contenant la séquence d'ADN selon l'une des revendications 6-9 et à une cellule hôte transformée avec ledit vecteur; pour les revendications 15 et 16 dans la mesure où ces revendications se réfèrent à l'utilisation du gène du facteur de transcription ou du facteur de transcription codé par ce gène, selon l'une des revendications 1, 6-9 ou aux analogues du polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2, selon la revendication 10).

- 3). L'objet de la revendication 10 (en ce qui concerne le polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2) comporte des différences avec la séquence du polypeptide de D1 aux positions respectives correspondantes 105 et 163, 156 et 214, 320 à 329 et 378 à 387. En plus, le polypeptide hTFIIIA de la présent invention, ayant la séquence SEQ ID N°2, débute en position 60 de la séquence du polypeptide de D1.

L'objet de la revendication 2 diffère de la séquence d'ADN de D1 en ce que la séquence d'ADN de D1 code pour une protéine ayant les différences de séquence mentionnées ci-dessus.

L'objet des revendications 3-5 diffère de la séquence d'ADN de D1 en ce que cette séquence d'ADN de D1 comprend des modifications introduites par suppression, insertion et substitution de nucléotides par rapport aux séquences de nucléotides SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4.

L'objet des revendications 2-6 (pour la revendication 6 dans la mesure où cette revendication se réfère a les revendications 2-5), 10 (pour la revendication 10 en ce qui concerne le polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2) est donc nouveau (article 33(2) PCT).

- 4.1). Au vu du document D1 mentionné ci-dessus, le problème que la présente invention se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture d'une protéine alternative ayant la fonction biologique du facteur de transcription humain hTFIIIA, des produits correspondants (gène codant pour ladite protéine, vecteur et cellule hôte correspondants) et l'utilisation de la protéine ou du gène correspondant.

- 4.2). La solution de ce problème proposée dans les revendications 2-5 et 10 (pour la revendication 10 en ce qui concerne le polypeptide ayant la séquence SEQ ID N°2) de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes: D1 ne donne aucune signe qui pourrait être considéré comme un suggestion pour l'homme de métier de rechercher l'existence de la protéine ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 ou du gène correspondant.
- 5). Les revendications 11-16, dans la mesure où ils se réfèrent à un procédé de préparation de la protéine recombinante hTFIIIA ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 (rev. 11), à un vecteur d'expression contenant la séquence d'ADN selon l'une des revendications 3 à 6 (rev. 12; pour la revendication 6 dans la mesure où cette revendication se réfère a les revendications 2-5), à une cellule hôte transformée avec ledit vecteur (rev. 13), à un plasmide contenant la région d'ADNc codante de hTFIIIA selon la présente invention (rev. 14) et à l'utilisation pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou traitement de maladies, impliquant les séquences d'ADN SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4, ou la protéine ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 (rev. 15 et 16), satisfont également aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté (article 33(2) PCT) et l'activité inventive (article 33(3) PCT).

Concernant le point VIII**Observations relatives à la demande internationale**

Il n'est pas indiqué dans les revendications 8 et 9 si les homologues se réfèrent à toute la longueur en entier des séquences impliquées ou à des fragments.

Par conséquent, l'objet des revendications 8 et 9 est ambigu et les revendications 8 et 9 ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT.

PATENT CO-OPERATION TREATY

Issued by: THE INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (rule 71.1 of the PCT)

Addressee:

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude
AVENTIS PHARMA S.A.
102, route de Noisy
F-93235 Romainville Cedex
FRANCE

Date of issue
(day/month/year) 21.02.2001

File reference of the applicant or of the authorized agent
2503/PCT

IMPORTANT COMMUNICATION

International application no.
PCT/FR99/02738

International filing date (day/month/year)
09/11/1999

Priority date (day/month/year)
10/11/1998

Applicant
AVENTIS PHARMA S.A. et al.

1. The applicant is hereby advised that the international preliminary examining authority has produced the international preliminary examination report for the international application and is sending it to him in the attached together with its annexes where appropriate.
2. A copy of the present report and, where appropriate, of its annexes is being sent to the International Office for communication to all the elected offices.
3. If any elected office so requires, the International Office will produce an English translation of the report (except for the annexes to the latter) and will send it to the offices concerned.

4. REMINDER

In order to commence the national phase at each elected office, the applicant must carry out certain actions (filing of translation and payment of national charges) within a period of 30 months starting from the priority date (or later in the case of some offices) (article 39.1) (see also the reminder issued by the International Office in form PCT/IB/301).

When a translation of the international application has to be sent to an elected office, it must include the translation of any annex to the international preliminary examination report. The applicant is responsible for the production of the translation in question and for its direct dispatch to each elected office concerned.

For further details concerning the applicable deadlines and the requirements of the elected offices, see Volume II of the PCT Guide for Applicants.

Name and postal address of the international preliminary
examining authority
European Patent Office P.O. Box 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Netherlands
Tel. + 31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: + 31 70 340 - 3016

Authorized official

Sinanovic, E

Tel. +31 70 340-2672

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or authorized agent's file reference 2503/PCT	FOR FURTHER ACTION see notification of transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/FR99/02738	International filing date (day/month/year) 09/11/1999	Priority date (day/month/year) 10/11/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/12		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT comprises 6 sheets, including the present cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> It is accompanied by ANNEXES, that is to say sheets of the description, claims or drawings which have been amended and which serve as the basis for this report or sheets containing rectifications made before this Authority responsible for the international preliminary examination (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations on the international application</p>		
Date of submission of the request for international preliminary examination 23/05/2000	Date of completion of this report 21.02.2001	
Name and postal address of the authority responsible for the international preliminary examination European Patent Office P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Netherlands Tel. + 31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: + 31 70 340 - 3016	<p>Authorized officer</p> <p>Macchia, G.</p> <p>Telephone no. +31 70 340 4078 [stamp]</p>	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR99/02738

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of the following material (*the substitute sheets which have been sent to the receiving office in response to a request made in accordance with Article 14 are considered, in this report, as having been "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (rules 70.16 and 70.17).*):

Description, pages:

1-26 as originally filed

Claims, nos.:

1-16 as originally filed

Drawings, sheets:

1/7-7/7 as originally filed

Portion of application reserved for sequence listing, pages:

1-6, as originally filed

2. As regards the **language**, all the elements indicated above were at the disposal of the administration or were furnished to it in the language in which the international application was filed, except where a contrary indication is given regarding this point.

These elements were at the disposal of the administration or were delivered to it in the following language, which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (according to rule 23.1(b)).

☐ the publication language of the international application (according to rule 48.3(b)).

☐ the translation language furnished for the purposes of the international preliminary examination report (according to rule 55.2 or 55.3)

3. As regards the **nucleotide or amino acid sequences** disclosed in the international application (if appropriate), the international preliminary examination report was carried out on the basis of the sequence listings:

☒ contained in the international application, in written form.

☒ filed with the international application, in computer-readable form.

☐ furnished to the administration later, in written form.

☐ furnished to the administration later, in computer-readable form.

☐ The declaration, according to which the sequence listing in writing and provided later does not go further than the disclosure made in the application as filed, was provided.

☐ The declaration, according to which the information recorded in computer readable form is identical to that of the sequence listings presented in writing, was provided.

4. The amendments have led to the revocation:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR99/02738

☐ of the description, pages:

☐ of the claims, Nos.:

☐ of the drawings, pages:

5. ☐ The present report was drawn up disregarding (some of) the amendments, which were considered as going further than the disclosure of the invention as filed, as indicated hereafter (rule 70.2(c)):

(Any amended page comprising amendments of this type must be indicated in point 1 and attached to the present report)

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes: Claims	completely: 2-5, 11, 14, partially: 6, 10, 12-13, 15-16
	No: Claims	completely: 1, 7-9; partially: 6, 10, 12-13, 15-16
Inventive step	Yes: Claims	completely: 2-5, 11, 14, partially: 6, 10, 12-13, 15-16
	No: Claims	completely: 1, 7-9; partially: 6, 10, 12-13, 15-16
Industrial applicability	Yes: Claims	1-16
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VIII. Observations on the international application

The following observations were made as regards the clarity of the claims, the description and the drawings and the question of whether the claims are based entirely on the description:

see separate sheet

Concerning point V

Reasoned statement in accordance with rule 66.2(a)(ii) regarding novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1). Reference is made to the following document:

D1: EP-A-0 704 526 (OTSUKA PHARMA CO., LTD. (JP); FUJIWARA T.;
TAKEDA S.; SHIMADA Y.; OZAKI K.; SHIN S.). 3rd April 1996 (1996-04-03).

- 2). Document D1, which is regarded as representing the most relevant state of the art, discloses a DNA sequence (htfIIIA gene) of the gene coding for a protein having the biological function of the human transcription factor hTFIIIA (D1: abstract, pages 6 and 11-13). This sequence has a 99.5% nucleotide sequence homology with the sequences SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 4 of the present invention, over the whole length, and contains modifications introduced by suppression, insertion and substitution of nucleotides relative to the aforementioned SEQ ID No. 3 and SEQ ID no. 4 (the "Bestfit" program of the University of Wisconsin "Genetic Computer Group" was used for all the sequence homology analyses reported here).

The DNA sequence of D1 codes for a protein the amino acid sequence of which has a 96% homology with the sequence SEQ ID No. 2 of the present invention, over the whole length. This protein is thus an analogue of the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2.

Document D1 describes an expression vector containing the aforementioned DNA sequence "htfIIIA gene" and a host cell transformed with the said vector (D1: page 4 and claims 5 and 7).

Moreover, document D1 describes the use of the gene of the human transcription factor htfIIIA or of the human transcription factor coded by this gene for the preparation of compositions useful for the diagnosis or treatment of illnesses associated with a disorder in the control of the transcription, in particular for cancer (D1: page 4 and claims 8 and 9).

EXAMINATION REPORT – SEPARATE SHEET

In the light of the above references, the subject-matter of claims 1, 6-10, 12, 13, 15 and 16 is thus not novel (article 33(2) PCT; for claim 6 inasmuch as this claim refers to claim 1 or to the DNA sequences which display significant homologies with the sequences SEQ ID No. 3 or SEQ ID No. 4 of the present invention; for claim 10, as regards the analogues of the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2; for claims 12 and 13 inasmuch as these claims refer to a vector containing the DNA sequence according to one of claims 6-9 and to a host cell transformed with the said vector; for claims 15 and 16 inasmuch as these claims refer to the use of the gene of the transcription factor or of the transcription factor coded by this gene, according to one of claims 1, 6-9 or to the analogues of the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2, according to claim 10).

- 3). The subject-matter of claim 10 (as regards the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2) contains differences from the sequence of the polypeptide of D1 at the corresponding respective positions 105 and 163, 156 and 214, 320 to 329 and 378 to 387. Moreover, the hTFIIIA polypeptide of the present invention, having the sequence SEQ ID No. 2, starts at position 60 of the sequence of the polypeptide of D1.

The subject-matter of claim 2 differs from the DNA sequence of D1 in that the DNA sequence of D1 codes for a protein having the sequence differences mentioned above.

The subject-matter of claims 3-5 differs from the DNA sequence of D1 in that this DNA sequence of D1 contains modifications introduced by suppression, insertion and substitution of nucleotides relative to the sequences of nucleotides SEQ ID No. 3 and SEQ ID No. 4.

The subject-matter of claims 2-6 (for claim 6 inasmuch as this claim refers to claims 2-5), 10 (for claim 10 as regards the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2) is thus novel (article 33(2) PCT).

- 4.1) In the light of document D1 mentioned above, the problem that the present invention proposes to resolve can be seen as the provision of an alternative protein having the biological function of the human transcription factor hTFIIIA, corresponding products (gene coding for the said protein, corresponding vector and host cell) and the use of the protein or of the corresponding gene.

EXAMINATION REPORT – SEPARATE SHEET

- 4.2) The solution to this problem that is proposed in claims 2-5 and 10 (for claim 10 as regards the polypeptide having the sequence SEQ ID No. 2) of the present application is seen as involving an inventive step (article 33(3) PCT), for the following reasons: D1 gives no indication that could be regarded as suggesting that the person skilled in the art seek the existence of the protein having the sequence of amino acids SEQ ID No. 2 or of the corresponding gene.
- 5). Claims 11-16, inasmuch as they refer to a preparation process of the recombinant protein hTFIIIA having the sequence of amino acids SEQ ID No. 2 (cl. 11), to an expression vector containing the DNA sequence according to one of claims 3 to 6 (cl. 12; for claim 6 inasmuch as this claim refers to claims 2-5), to a host cell transformed with the said vector (cl. 13), to a plasmid containing the cDNA region coding for hTFIIIA according to the present invention (cl. 14) and to the use for the preparation of compositions useful for the diagnosis or treatment of diseases, involving the DNA sequences SEQ ID No. 3 or SEQ ID No. 4, or the protein having the sequence of amino acids SEQ ID No. 2 (cl. 15 and 16), also satisfy the requirements of the PCT as regards novelty (article 33(2) PCT) and inventive step (article 33(3) PCT).

Concerning point VIII**Comments relating to the international application**

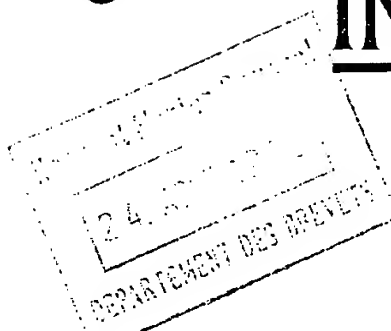
It is not indicated in claims 8 and 9 whether the homologies refer to the entire length of the sequences involved or to fragments.

Consequently, the subject-matter of claims 8 and 9 is ambiguous and claims 8 and 9 do not satisfy the requirements of article 6 PCT.

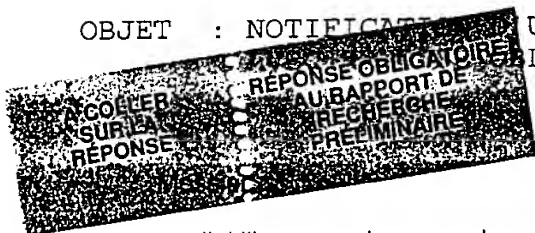
INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

09/831426

JC08 Rec'd PCT/PTO 08 MAY 2007

HOECHST MARION ROUSSEL
DEPARTEMENT DES BREVETS
102/111 ROUTE DE NOISY
93235 ROMAINVILLE CEDEXDEMANDE DE : BREVET
N° : 9814146000 DU 10/11/98
V/REF. : ML/2503

PARIS, LE 20 AOUT 1999

OBJET : NOTIFICATION D'UN RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
OBLIGATOIRE

J'ai l'honneur de vous adresser, en annexe, le rapport de recherche préliminaire établi conformément à l'article R.612-57 du code de la propriété intellectuelle, citant les documents qui peuvent être pris en considération pour apprécier la nouveauté et l'activité inventive de l'invention, objet de votre demande.

Selon l'article R.612-59 du code précité, vous disposez d'un délai de **3 mois** à compter de la date de réception de ce rapport de recherche préliminaire pour y répondre par écrit. Avant l'expiration de ce délai, celui-ci peut être renouvelé une fois sur votre requête.

Suivant la catégorie des documents cités, vous pouvez être tenu à une obligation de réponse (par exemple, si le rapport de recherche préliminaire mentionne des documents de catégorie **X** ou **Y**). Dans ce cas, un papillon **rouge** est apposé sur cette lettre et le défaut de réponse entraînera le rejet de la demande. Dans le cas contraire, ce papillon est **jaune**.

Dans tous les cas, il est de votre intérêt en élaborant votre réponse, de tenir compte de tous les documents cités.

Selon les articles R.612-58 et R.612-60 du code précité, votre réponse peut consister :

- soit en de nouvelles revendications (en 3 exemplaires). Dans ce cas, vous devez signaler les changements apportés aux revendications initiales. Vous pouvez y joindre des observations qui mettent en évidence les caractéristiques techniques de ces nouvelles revendications qui échappent à l'opposabilité des antériorités citées.
- soit seulement en des observations qui ont alors pour objet de discuter l'opposabilité des antériorités citées.

Veuillez agréer l'expression de ma considération distinguée.

Pour le Directeur général de l'Institut national
de la propriété industrielle

Le Chef du département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X,D	EP 0 704 526 A (OTSUKA PHARMA CO LTD (JP); FUJIWARA T; TAKEDA S; SHIMADA; OZAKI; SHIN) 3 avril 1996 (1996-04-03)	1-16
Y	* le document en entier *	15,16
X,D	DREW P.D. ET AL.: "Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA" GENE, vol. 159, no. 2, 4 juillet 1995 (1995-07-04), pages 215-218, XP004042209 ISSN: 0378-1119	1-14
Y	* le document en entier *	15,16
X,D	ARAKAWA H. ET AL.: "Molecular cloning, characterization, and chromosomal mapping of a novel human gene (GTF3A) that is highly homologous to Xenopus transcription factor IIIA" CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 70, no. 3 4, 1995, pages 235-238, XP002111350	1-14
Y	* le document en entier *	15,16
X	SEIFART K.H. ET AL.: "Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 3, 25 janvier 1989 (1989-01-25), pages 1702-1709, XP002111250 * page 1703 *	10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) C12N C07K C12Q A61K G01N
		-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 août 1999		Macchia, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 570797
FR 9814146

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	MOOREFIELD B. AND ROEDER R.G.: "Purification and characterization of human transcription factor IIIA" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 33, 19 août 1994 (1994-08-19), pages 20857-20865, XP002111251 * page 20858 *	10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 août 1999		Macchia, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. O : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

FA 570797
FR 9814146

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0704526 A	03-04-1996	JP 8070870 A	19-03-1996
		CA 2157531 A	06-03-1996
		CN 1134460 A	30-10-1996
		US 5808030 A	15-09-1998

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2503/PCT	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02738	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09/11/1999	Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 10/11/1998
Déposant HOECHST MARION ROUSSEL et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/50
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 704 526 A (OTSUKA PHARMA CO LTD (JP); FUJIWARA T; TAKEDA S; SHIMADA; OZAKI; SHIN) 3 April 1996 (1996-04-03) cited in the application	1-16
Y	the whole document	15, 16
X	DREW P.D. ET AL.: "Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA" GENE, vol. 159, no. 2, 4 July 1995 (1995-07-04), pages 215-218, XP004042209 ISSN: 0378-1119 cited in the application	1-14
Y	the whole document	15, 16
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2000

Date of mailing of the international search report

01/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/FR 99/02738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARAKAWA H. ET AL.: "Molecular cloning, characterization, and chromosomal mapping of a novel human gene (GTF3A) that is highly homologous to Xenopus transcription factor IIIA"</p> <p>CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 70, no. 3 4, 1995, pages 235-238, XP002111350</p> <p>cited in the application</p>	1-14
Y	<p>the whole document</p> <p>---</p>	15, 16
X	<p>Database EMBL</p> <p>ID HS1324490</p> <p>AC AA534893</p> <p>25 juillet 1997</p> <p>99% identité nt.597-1158</p> <p>brin complémentaire</p> <p>XP002130428</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-14
X	<p>SEIFART K.H. ET AL.: "Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 3, 25 January 1989 (1989-01-25), pages 1702-1709, XP002111250</p> <p>page 1703</p> <p>page 1704, right-hand column; figure 2</p> <p>page 1705, left-hand column; figure 3</p> <p>---</p>	10
X	<p>MOOREFIELD B. AND ROEDER R.G.: "Purification and characterization of human transcription factor IIIA"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 33, 19 August 1994 (1994-08-19), pages 20857-20865, XP002111251</p> <p>cited in the application</p> <p>page 20858</p> <p>page 20859; figure 1</p> <p>page 20861; figure 3</p> <p>---</p>	10
X	<p>WALDSCHMIDT R. ET AL.: "Physical and immunological characterization of human transcription factor IIIA"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 194, no. 1, November 1990 (1990-11), pages 167-176, XP000876773</p> <p>abstract</p> <p>page 168, right-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02738

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0704526 A	03-04-1996	JP 2946019 B	06-09-1999
		JP 8070870 A	19-03-1996
		CA 2157531 A	06-03-1996
		CN 1134460 A	30-10-1996
		US 5808030 A	15-09-1998
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Je internationale No

PCT/FR 99/02738

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/50
A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K C12Q A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 704 526 A (OTSUKA PHARMA CO LTD (JP); FUJIWARA T; TAKEDA S; SHIMADA; OZAKI; SHIN) 3 avril 1996 (1996-04-03) cité dans la demande	1-16
Y	le document en entier	15, 16
X	DREW P.D. ET AL.: "Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to Xenopus TFIIIA" GENE, vol. 159, no. 2, 4 juillet 1995 (1995-07-04), pages 215-218, XP004042209 ISSN: 0378-1119 cité dans la demande	1-14
Y	le document en entier	15, 16

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des le Internationale No

PCT/FR 99/02738

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARAKAWA H. ET AL.: "Molecular cloning, characterization, and chromosomal mapping of a novel human gene (GTF3A) that is highly homologous to Xenopus transcription factor IIIA"</p> <p>CYTOGENETICS AND CELL GENETICS, vol. 70, no. 3 4, 1995, pages 235-238, XP002111350</p> <p>cité dans la demande</p>	1-14
Y	<p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	15, 16
X	<p>Database EMBL</p> <p>ID HS1324490</p> <p>AC AA534893</p> <p>25 juillet 1997</p> <p>99% identité nt.597-1158</p> <p>brin complémentaire</p> <p>XP002130428</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
X	<p>SEIFART K.H. ET AL.: "Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 3, 25 janvier 1989 (1989-01-25), pages 1702-1709, XP002111250</p> <p>page 1703</p> <p>page 1704, colonne de droite; figure 2</p> <p>page 1705, colonne de gauche; figure 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	10
X	<p>MOOREFIELD B. AND ROEDER R.G.: "Purification and characterization of human transcription factor IIIA"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 33, 19 août 1994 (1994-08-19), pages 20857-20865, XP002111251</p> <p>cité dans la demande</p> <p>page 20858</p> <p>page 20859; figure 1</p> <p>page 20861; figure 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	10
X	<p>WALDSCHMIDT R. ET AL.: "Physical and immunological characterization of human transcription factor IIIA"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 194, no. 1, novembre 1990 (1990-11), pages 167-176, XP000876773</p> <p>abrégé</p> <p>page 168, colonne de droite, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le internationale No

PCT/FR 99/02738

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0704526 A	03-04-1996	JP 2946019 B	06-09-1999
		JP 8070870 A	19-03-1996
		CA 2157531 A	06-03-1996
		CN 1134460 A	30-10-1996
		US 5808030 A	15-09-1998

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Gène humain htflIIIA et la protéine codée hTflIIIA

La présente invention concerne le gène codant pour le facteur de transcription humain nommé ci-après gène htflIIIA (ou htfc2) et la protéine codée hTflIIIA ainsi que l'utilisation de ce gène htflIIIA et celui de la protéine codée hTflIIIA dans le diagnostic et l'identification de certaines maladies liées au mécanisme de la transcription.

Nous appellerons ci-après tflIIIA (ou tfc2) le gène codant pour le facteur de transcription TflIIIA et htflIIIA le gène codant pour le facteur de transcription humain hTflIIIA. Le gène humain htflIIIA code donc pour la protéine correspondante hTflIIIA.

Nous utiliserons également ci-après les abréviations suivantes : AA pour acides aminés, AN pour acides nucléiques, pb pour paires de bases, ADN pour acide désoxyribonucléique, ADNc pour ADN complémentaire, ARN pour acide ribonucléique et RNase pour ribonucléase et C pour désoxycytidine.

On utilisera également le terme screening qui désigne une technique de criblage spécifique et le terme primer qui désigne un oligonécléotide utilisé en amorce. Le gène tflIIIA et la protéine correspondante TflIIIA seraient impliqués dans la régulation du mécanisme biologique de la transcription comme indiqué ci-après.

Depuis que la protéine TflIIIA a été purifiée comme facteur de transcription pour la première fois en 1980 à partir d'ovocytes de Xénope [Segall et al, J. Biol. Chem., 255, 11986-11991 (1980)], des travaux ont été menés in vivo et in vitro dans le Xénope pour étudier le mécanisme de contrôle de la transcription exercé par TflIIIA. On a ainsi montré que TflIIIA de Xénope est nécessaire pour l'initiation de la transcription du gène ARN 5S [Sakonji et al, Cell 19, 13-25 (1980)] et se lie à une région de contrôle interne du gène ARN 5S [Bogenghagen et al, Cell, 19, 27-35 (1980)].

La séquence en nucléotides de l'ADNc de tflIIIA de Xénope et la séquence correspondante d'acides aminés ont déjà été publiées [Ginberg et al, Cell 39, 479-489 (1984)]. On peut noter que ce gène code pour une structure en 9 doigts de

zinc, un doigt de zinc correspondant à la répétition du motif CYS2 HIS2 (C2H2). Cette structure en doigt de zinc est considérée comme un domaine essentiel pour un groupe de protéines qui se lient à l'ADN (DNA binding proteins) [Miller et al, Embo J., 4, 1607-1614 (1985)].

On connaît ainsi dans l'être humain des facteurs de transcription se liant à l'ADN qui possèdent également cette structure en doigt de zinc tels que par exemple XT1 du gène de la tumeur humaine de Wilms, [Gessier et al, Nature, 343, 774-778 (1990)], le répresseur humain de transcription YY1 [SHI et al, Cell, 67, 377-388 (1991)], la protéine MAZ associée au gène humain MYC [Bossone et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, 7452-7456 (1992)] ou encore spl [Kawahara et al, J. Biol. Chem., 29, 8627-8631 (1990)].

Des travaux ont été effectués afin d'isoler le gène humain htflIIIA, mais aucun jusqu'ici n'a abouti à mettre en évidence la véritable séquence du gène htflIIIA.

On peut citer ainsi d'une part les travaux décrits dans la demande européenne EP 0704526 (Fujisawa et al), et repris dans l'article : Arakawa et al (1995), Cytogenet Cell Genet 70, 235-238, qui ont abouti à une séquence que nous appellerons htflIIIA de Arakawa et d'autre part les travaux décrits dans l'article : DREW et al (1995), Gene 159, 215-218, qui ont abouti à une séquence que nous appellerons htflIIIA de DREW. Ces séquences htflIIIA de DREW et de ARAKAWA sont représentées respectivement aux figures 4 et 5 ci-après. Les documents indiqués ci-dessus décrivent donc chacun une séquence du gène htflIIIA mais ces deux séquences diffèrent l'une de l'autre par quelques nucléotides et diffèrent du gène htflIIIA de la présente demande comme indiqué ci-après.

La présente invention a permis d'isoler le gène codant pour le facteur de transcription humain htflIIIA.

La présente invention a également permis de révéler la séquence d'acides nucléiques du gène htflIIIA et également la séquence d'acides aminés de la protéine htflIIIA codée par ce gène.

La présente invention a ainsi pour objet la séquence d'ADN du gène htflIIIA codant pour une protéine ayant la

fonction biologique du facteur de transcription humain htfIIIA.

La présente invention a précisément pour objet la séquence d'ADN du gène htfIIIA du facteur de transcription
5 humain htfIIIA telle que définie ci-dessus codant pour la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2.

Une telle séquence SEQ ID n°2 de la présente invention comprend donc 365 acides aminés.

La présente invention a aussi pour objet la séquence
10 d'ADN du gène htfIIIA comme défini ci-dessus contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°3.

La présente invention a aussi pour objet la séquence d'ADN du gène htfIIIA comme défini ci-dessus contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°4.

15 La présente invention a aussi pour objet la séquence d'ADN du gène htfIIIA comme défini ci-dessus correspondant à la séquence de nucléotides SEQ ID N°3.

La séquence SEQ ID N°3 comprend donc 1273 nucléotides.

La présente invention a notamment pour objet la séquence
20 d'ADN du gène htfIIIA comme défini ci-dessus correspondant à la séquence de nucléotides SEQ ID N°4. La séquence SEQ ID N°4 comprend donc 1213 nucléotides.

La séquence SEQ ID N°1 représente sur la ligne supérieure la séquence de nucléotides du gène htfIIIA selon la présente
25 invention soit SEQ ID N°3, et sur la ligne inférieure, la séquence correspondante en acides aminés (AA) de cette séquence de nucléotides soit SEQ ID N°2.

Les figures 1 et 2 ci-après représentent sur la ligne supérieure la séquence d'AA codée par htfIIIA de la présente
30 invention SEQ ID N°2 et sur la ligne inférieure, les séquences d'AA codées respectivement par les gènes htfIIIA de DREW, à la figure 1, et de ARAKAWA, à la figure 2, ces séquences de DREW et ARAKAWA étant telles que publiées dans les documents référencés ci-dessus.

35 La figure 3 ci-après représente la comparaison des séquences d'AA codées respectivement par les gènes htfIIIA de DREW et de ARAKAWA avec sur la ligne supérieure, la séquence d'AA codée par htfIIIA de ARAKAWA et sur la ligne inférieure,

la séquence d'AA codée par htfIIIA de DREW.

La figure 2 montre donc que la séquence d'AA correspondante de htfIIIA selon la présente invention comporte des différences avec la séquence d'AA publiée dans
5 l'article de ARAKAWA ou dans EP 0704 526, notamment aux positions respectives correspondantes 105 et 163, 156 et 214, 320 à 329 et 378 à 387, ces positions étant données par rapport à la numérotation indiquée sur la figure 2.

Cette figure 2 montre également que la séquence d'AA
10 codée par htfIIIA de la présente invention débute en position 59 de la séquence en AA de htfIIIA de ARAKAWA.

La figure 3 montre que les séquences d'AA codées par htfIIIA de ARAKAWA et de DREW comportent des différences aux positions respectives correspondantes 214 et 154, 378-387 et
15 318-327, ces positions étant données par rapport à la numérotation indiquée sur la figure 3.

La figure 5 montre que la séquence htfIIIA de ARAKAWA code pour une protéine dont la séquence en acides aminés, indiquée dans EP 0704 526, commence par l'AA méthionine
20 spécifié par le codon ATG qui se trouve en position 20-22 et la traduction s'arrête à un codon TAA. Si l'on compare la séquence de nucléotides de htfIIIA selon la présente invention SEQ ID N°3 avec la séquence de nucléotides de EP 0704 526 soit htfIIIA de ARAKAWA représentée à la figure 5
25 (séquence p11-12-13 de EP 0704 526), on constate qu'il manque un nucléotide C à la position 127 de la séquence de EP 0704 526. Ce nucléotide C supplémentaire a pour conséquence un décalage dans la traduction en acides aminés de cette séquence de nucléotides : en effet, l'ATG qui se trouve à la
30 position 20-22 de la séquence de ARAKAWA représentée à la figure 5 et qui est considéré comme codon initiateur de la synthèse protéique par ARAKAWA n'est donc plus, du fait de ce décalage, dans la même phase de lecture. En tenant compte de ce nucléotide supplémentaire C, la traduction en AA fait
35 apparaître un codon de terminaison TGA en position 57-59 de la séquence de ARAKAWA représentée à la figure 5. Par conséquent, le codon initiateur de la synthèse protéique selon la présente invention est localisée en aval de ce codon

de terminaison. Des expériences de traduction in vitro de SEQ ID N°4 et des tests d'expression dans des cellules de mammifères telles que des cellules Cos ont permis d'identifier le codon d'initiation de la synthèse protéique de hTFIIIA selon la présente invention.

Ce codon initiateur de la synthèse protéique de hTFIIIA selon la présente invention est le codon CTG en position 176-178 de SEQ ID N°3 (qui correspondrait à la position 194-196 de la séquence de ARAKAWA représentée à la figure 5).

La partie codante du gène htfIIIA de la présente invention commence donc par ce codon CTG qui se trouve à la position 176-178 de SEQ ID N°3 qui devrait correspondre à l'AA Leucine et qui correspond en fait à l'AA Méthionine puisque ce codon est reconnu comme codon initiateur (ref : David S. Peabody The Journal of Biological Chemistry, vol. 264, n°9, pp. 5031-5035, 1989).

En conséquence, la protéine hTFIIIA de ARAKAWA est plus longue comme le montre la figure 2, que la protéine hTFIIIA de la présente invention.

Par ailleurs, si l'on compare la protéine hTFIIIA de la présente invention et la protéine hTFIIIA de DREW, (comparaison représentée à la figure 1), on constate que l'acide aminé thréonine en position 105 de la protéine hTFIIIA de la présente invention correspond à un résidu asparagine en position 103 dans la séquence hTFIIIA de DREW et que les deux premiers AA, M et D de la protéine hTFIIIA de la présente invention n'ont pas été déterminés pour la protéine hTFIIIA de DREW. L'absence des codons spécifiant ces AA et notamment l'absence du codon initiateur de la synthèse protéique, ne permet pas l'expression de cette protéine. La séquence htfIIIA de DREW représentée à la figure 4 est donc incomplète, comme le reconnaissent les auteurs de la publication référencée ci-dessus (DREW et al à la page 216 lignes 39-41). On peut noter d'ailleurs que les auteurs de cet article pensent également que le codon initiateur de la séquence htfIIIA de DREW devrait correspondre à une méthionine codée par ATG comme dans la séquence de ARAKAWA.

Le gène htfIIIA selon la présente invention est donc

différent des gènes htFIIIA de DREW et ARAKAWA (EP 0704526) et code pour une protéine hTFIIIA dont la séquence en AA est différente de celle des protéines hTFIIIA de DREW et ARAKAWA.

La présente invention a ainsi particulièrement pour
5 objet la séquence d'ADN du gène htFIIIA comme défini ci-dessus contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°3.

La présente invention a plus particulièrement pour objet la séquence d'ADN comme défini ci-dessus ayant la séquence commençant au nucléotide 176 et se terminant au nucléotide
10 1270 de SEQ ID N°3.

Une telle séquence de la présente invention commence donc à un codon CTG et comprend donc 1095 nucléotides.

La présente invention a également pour objet la séquence d'ADN codant pour le facteur de transcription humain hTFIIIA
15 comme défini ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent des homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci et codant pour des protéines ayant la même fonction. Par séquences qui hybrident, on inclut les séquences d'ADN
20 qui hybrident avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus sous des conditions standard de stringence élevée, moyenne ou basse. Par protéines ayant la même fonction, on inclut les polypeptides ayant la même fonction de facteur de transcription. Les conditions de stringence sont celles réalisées dans
25 les conditions connues de l'homme du métier telles que celles décrites par Sambrook et al (1989) Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. De telles conditions de stringence sont par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x Denhardt's ;
30 100µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 3 lavages pendant 5 minutes avec 2 x SSC ; 0,05 % SDS, puis 3 lavages pendant 15 minutes à 65°C dans 1 x SSC ; 0,1 % SDS. Les conditions de forte stringence comprennent par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x
35 Denhardt's ; 100µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 2 lavages pendant 20 minutes avec une solution 2 x SSC ; 0,05 % SDS à 65°C suivis d'un dernier lavage pendant 45 minutes dans une solution 0,1 x SSC ; 0,1 % SDS à 65°C. Les conditions de

stringence moyenne comprennent par exemple un dernier lavage pendant 20 minutes dans une solution 0,2 x SSC, 0,1 % SDS à 65°C.

Par séquences qui présentent des homologues significatives,
5 on inclut les séquences ayant une identité de séquence nucléotidique d'au moins 50 % avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus et qui codent pour une protéine ayant la même fonction de facteur de transcription.

La présente invention a également pour objet la séquence
10 d'ADN comme défini ci-dessus comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité biologique que le facteur de transcription humain hTFIIIA.

15 La présente invention a notamment pour objet la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN similaires qui ont une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN.

20 La présente invention a ainsi également pour objet la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui codent pour une protéine dont la séquence en AA a une homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au
25 moins 70 % avec la séquence en AA codée par ladite séquence d'ADN.

Le gène de la présente invention est représenté comme une séquence ADN simple brin mais il est entendu que la présente invention inclut la séquence ADN complémentaire de
30 cette séquence ADN simple brin et inclut également la séquence ADN dite double brin constituée de ces deux séquences ADN complémentaires d'une de l'autre.

La séquence ADN de la présente invention est un exemple de combinaison de codons codant pour les acides aminés
35 correspondant à la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 mais il est entendu également que la présente invention inclut toute autre combinaison arbitraire de codons codant pour cette même séquence d'acides aminés SEQ ID N°2.

La séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ou cette séquence d'ADN modifiée comme indiquée ci-dessus, peut être préparée selon les techniques connues de l'homme du métier et notamment celles décrites dans l'ouvrage de Sambrook, J. Fritsh, E. F. & Maniatis, T. (1989) intitulé : " Molecular cloning : a laboratory manual ", Laboratory, Cold Spring Harbor NY. Notamment la séquence d'ADN ci-dessus peut être une séquence d'ADNc obtenue par identification des parties 3' et 5' de la séquence codante, puis amplification de ces parties à l'aide d'une ADN polymérase telles que la pfu polymérase ou d'autres ADN polymérases. L'introduction, dans la séquence des oligonucléotides utilisés pour la PCR, de sites de restriction tels que Hind III ou SmaI permet le clonage de ces fragments dans des vecteurs adéquats et ensuite la reconstitution de la séquence complète recherchée. Une description détaillée des conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention est donnée ci-après.

L'invention a tout particulièrement pour objet le polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription humain hTFIIIA et ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 codée par la séquence d'ADN comme défini ci-dessus et les analogues de ce polypeptide.

Par analogues, on entend les polypeptides dont la séquence d'acides aminés a été modifiée par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés mais qui conservent la même fonction biologique. De tels polypeptides analogues peuvent être produits spontanément ou peuvent être produits par modification post-transcriptionnelle ou encore par modification de la séquence ADN de la présente invention comme indiqué ci-dessus, en utilisant les techniques connues de l'homme du métier : parmi ces techniques, on peut citer notamment la technique de mutagénèse dirigée (Kramer, W., et al., Nucl. Acids Res., 12, 9441 (1984) ; Kramer, W. and Fritz, H.J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987) ; Zoller, M.J. and Smith, M. Methods in Enzymology, 100, 468 (1983)).

La synthèse d'ADN modifiés peut également être faite en

utilisant des techniques de synthèse chimique bien connues telles que par exemple la méthode au phosphotriester [Letsinger, R.L and Ogilvie, K.K., K. Am. CHEM. Soc., 91, 3350 (1969) ; Merrifield, R.B., Sciences, 150, 178 (1968)] ou la
5 méthode à la phosphoamidite [Beaucage, S.L and Caruthers, M .H., Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981) ; McBRIDE, L.J. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Lett., 24 245 (1983)] ou encore par la combinaison de ces méthodes.

Les polypeptides de la présente invention peuvent donc
10 être préparés par les techniques connues de l'homme du métier, notamment partiellement par synthèse chimique ou encore par la synthèse de l'ADNc par expression dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote comme indiqué ci-après.

La présente invention a particulièrement pour objet le
15 procédé de préparation de la protéine recombinante hTFIIIA ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2. Ce procédé inclut l'expression de la séquence d'ADN comme défini ci-dessus dans un hôte approprié puis l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante.

20 Pour produire le polypeptide de la présente invention, on peut notamment utiliser les techniques de l'ADN recombinant en utilisant les méthodes de génie génétique et de culture cellulaire connues de l'homme du métier. On peut ainsi procéder par les étapes suivantes : d'abord préparation
25 du gène approprié, puis incorporation de ce gène dans un vecteur, transfert du vecteur porteur du gène dans une cellule hôte appropriée, expression du gène et enfin, purification de la protéine codée par ce gène.

Les séquences d'ADN selon la présente invention et notamment
30 SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4 peuvent être préparées selon les techniques connues de l'homme du métier, notamment par synthèse chimique, par criblage d'une banque génomique ou d'une banque d'ADNc à l'aide de sondes d'oligonucléotides de synthèse par les techniques connues d'hybridation ou encore
35 par reverse transcriptase à partir d'ARN messenger (ARNm).

L'avantage de la technique comprenant d'abord l'isolement d'ARNm par extraction des ARN totaux puis la synthèse d'ADNc à partir de ces ARNm par reverse transcriptase réside

notamment dans le fait que l'ARNm ne contient pas les introns alors que ces séquences non codantes sont présentes dans l'ADN génomique.

On peut donc notamment procéder comme suit.

- 5 On extrait d'abord les ARN totaux provenant d'une lignée cellulaire telle que par exemple la lignée cellulaire Raji (RNA Plus, BIOPROBE) et à partir de ces ARN, on procède ensuite à la synthèse de l'ADNc recherché en utilisant notamment un kit tel que ARN PCR kit (Perkin Elmer).

- 10 On peut noter que dans le cadre de la présente invention, deux oligonucléotides localisés aux extrémités de la séquence codante htFIIIA publiée par ARAKAWA (figure 5) ont été synthétisés soit OLT5 et OLT3 définis comme suit :

- OLT5 : 5' CGGGGTACCAAAA ATG CGC AGC AGC GGC GCC GAC 3' soit

- 15 SEQ ID N°5 et

- OLT3 : 5' CGGTCTAGA TTA GCC AAG GGT AAG TAC TGC 3' soit SEQ ID N°9

mais ces deux oligo-nucléotides n'ont pas permis d'obtenir un produit d'amplification par PCR.

- 20 Ainsi dans le cadre de la présente invention, la séquence codante de hTFIIIA a été isolée en deux étapes : d'abord identification de la partie 3' puis identification de la partie 5'.

- Après identification des parties 3' et 5', un site de
25 restriction HindIII localisé sur chacun de ces fragments a ensuite permis de reconstituer la séquence complète recherchée comme indiqué ci-après dans la partie expérimentale.

On a donc procédé comme suit :

La partie 3' a été amplifiée à l'aide de la pfu polymérase

- 30 (STRATAGENE) en utilisant comme amorce les oligonucléotides OLT5.2 et TFIIIA 3'SmaI soit :

- OLT5.2 : 5'TCCTTCCCTGACTGCAGCGCC 3' soit SEQ ID N°6 et

- TFIIIA3'SmaI : 5'CCT CCC GGG GCC AAG GGT AAG TAC TGC AAC 3'soit SEQ ID N°10

- 35 Les amorces d'amplification ou primers sont choisies en fonction de la partie à amplifier selon des critères usuels pour l'homme du métier.

Les amorces utilisées dans la présente invention ont été

choisies dans la séquence htfIIIA de ARAKAWA représentée à la figure 5.

Les séquences SEQ ID N°6, SEQ ID N°7 et SEQ ID N°8 sont situées respectivement aux positions 320-340 (5'-3'), 361-380 (séquence réverse et complémentaire) et 391-410 (séquence réverse et complémentaire) de cette séquence htfIIIA de ARAKAWA.

Les séquences SEQ ID N°5, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10 sont situées respectivement aux positions 20-40 (5'-3'), 1271-1291 (séquence réverse et complémentaire) et 1268-1288 (séquence réverse et complémentaire) de cette séquence htfIIIA de ARAKAWA.

On peut noter que dans les séquences SEQ ID N°5, SEQ ID N°9 et SEQ ID N°10 contiennent les séquences correspondant aux sites d'enzymes de restriction soit respectivement KpnI, XbaI et SmaI.

L'oligonucléotide TFIIIA 3' SmaI introduit un site de restriction SmaI en aval de la séquence codante. Ce site permet si nécessaire et si désiré la fusion de la séquence codant pour hTFIIIA avec une séquence codant pour un peptide épitope de l'hémagglutinine désigné " TAG HA ". L'expression de la séquence codant pour TFIIIA peut donc être associée à celle de la séquence codant pour TAG HA qui peut être détecté en analyse par Western blot, si le gène de fusion est exprimé.

Pour l'identification de la partie 5', cette région a été isolée par la technique de PCR ancrée 5' (5 race System, GIBCO BRL ; pfu polymerase, STRATAGENE). Deux PCR successives ont été effectuées en utilisant comme amorce les oligonucléotides suivants : UAP et TFIIIA PCR5' pour la première PCR et UAP et TFIIIA SEQ2 pour la seconde PCR. UAP est un oligonucléotide fourni dans le kit.

Ces oligonucléotides ont les séquences suivantes :

- TFIIIA PCR5' : 5' CACAAACAAATGGTCTCC 3' soit SEQ ID N°8
- TFIIIA SEQ2 : 5' TGCACAGGTGCGCGTCAAGC 3' soit SEQ ID N°7.

Les produits de ces PCR soit les fragments 5' et 3' amplifiés sont ensuite purifiés sur gel d'agarose et clonés en utilisant le TA cloning kit (INVITROGEN). On procède alors

au séquençage : l'ADN plasmidique de plusieurs clones indépendants est préparé (QIAGEN Plasmids KIT) et les fragments correspondant à la séquence codante de hTFIIIA sont séquencés sur les deux brins (Séquenceur ABI 377XL, PERKIN
5 ELMER).

On peut donc procéder comme suit et selon les techniques usuelles de clonage connues de l'homme du métier et notamment on procède au clonage par insertion de chaque fragment dans un plasmide fourni avec le kit commercial (TA cloning Kit
10 Invitrogen) puis transformation d'une souche bactérienne par le plasmide ainsi obtenu. On peut utiliser notamment la souche E. coli XL1 Blue.

Les clones sont ensuite cultivés pour extraire l'ADN plasmidique selon les techniques classiques de l'homme du
15 métier référencées ci-dessus (Sambrook, Fritsh et Maniatis).

On procède au séquençage de l'ADN du fragment amplifié contenu dans l'ADN plasmidique.

La compilation des données de la séquence ainsi obtenues fait apparaître qu'en 3', l'essentiel de la séquence isolée
20 correspond à la séquence htfIIIA de Drew et al.
En 5', la séquence la plus longue débute en position 80 de la séquence htfIIIA de Arakawa et al., représentée à la figure 2F, et fait apparaître l'insertion d'un nucléotide C en position 127 par rapport à cette séquence. Si l'on peut
25 supposer que la synthèse de l'ADNc dans l'application de la technique décrite ci-dessus n'a pas été complète, l'insertion d'un nucléotide crée cependant un problème majeur. En effet, l'addition d'un nucléotide dans la séquence codante crée un décalage de la phase de lecture. Afin de vérifier la présence
30 de ce nucléotide dans le gène htfIIIA, de l'ADN génomique humain a été analysé par PCR. Cet ADN a été soumis à une réaction PCR à l'aide de la pfu polymerase (STRATAGENE) ou de la Taq polymerase (Perkin Elmer) et en utilisant comme amorce les oligonucléotides OLT5 et TFIIIA SEQ2 nommés respecti-
35 vement SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7. Les deux produits PCR ont été clonés (TA cloning Kit) puis séquencés.

L'analyse des données de séquence confirme pour ces deux amplifications la présence de ce nucléotide C supplémentaire

par rapport à la séquence htFIIIA de ARAKAWA. L'ATG décrit initialement comme codon initiateur de la synthèse protéique pour htFIIIA de ARAKAWA ne peut donc plus être considéré comme tel.

5 On procède ensuite à l'assemblage des séquences 5' et 3' et obtient un plasmide unique contenant la séquence recherchée de htFIIIA de la présente invention. On reconstitue la séquence codante htFIIIA complète de la façon suivante. On digère un clone issu de l'amplification de l'ADN
10 génomique à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et HindIII, et on obtient après purification, un fragment de 350 pb environ. On digère par ailleurs un clone issu de l'amplification de la partie 3' à l'aide des enzymes de restriction HindIII et SmaI et on obtient après purification,
15 un fragment de 930 pb environ.

On procède ensuite à la ligation de ces fragments dans le plasmide pYX223 (vecteur d'expression pour la levure - RSD) préalablement digéré par EcoRI et SmaI.

Un exposé détaillé des conditions dans lesquelles
20 peuvent être menées les opérations indiquées ci-dessus est donné ci-après dans la partie expérimentale. On obtient ainsi un plasmide dans lequel est inséré le gène de la présente invention et on obtient ainsi également ce plasmide introduit dans une cellule hôte en opérant selon les techniques
25 usuelles connues de l'homme du métier.

Le polypeptide de la présente invention peut être obtenu par expression dans une cellule hôte contenant la séquence d'ADN codant pour le polypeptide de l'invention précédée d'une séquence promotrice convenable. La cellule hôte peut
30 être une cellule procaryote, par exemple E. coli ou une cellule eucaryote telle que les levures comme par exemple les ascomycètes parmi lesquels les Saccharomyces cerevisiae ou encore des cellules mammifères comme les cellules Cos.

La présente invention a particulièrement pour objet un
35 vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN comme défini ci-dessus.

Ainsi un tel vecteur d'expression selon la présente invention contient une séquence d'ADN qui peut être la

séquence de nucléotides SEQ ID N°3 ou la séquence commençant au nucléotide 176 et se terminant au nucléotide 1270 de SEQ ID N°3.

Un tel vecteur d'expression selon la présente invention peut également contenir les séquences d'ADN qui hybrident avec les séquences définies ci-dessus et/ou présentent des homologies significatives avec ces séquences ou des fragments de celles-ci.

Un tel vecteur d'expression selon la présente invention peut également contenir les séquences d'ADN qui comprennent des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité biologique que le facteur de transcription humain hTFIIIA.

Les vecteurs d'expression sont des vecteurs permettant l'expression de la protéine sous le contrôle d'un promoteur convenable. Un tel vecteur peut être un plasmide, un cosmide ou un ADN viral. Pour les cellules procaryotes, le promoteur peut être par exemple le promoteur lac, le promoteur trp, le promoteur tac, le promoteur β -lactamase ou le promoteur PL. Pour les cellules de levure, le promoteur peut être par exemple le promoteur PGK ou le promoteur GAL. Pour les cellules de mammifères, le promoteur peut être par exemple le promoteur SV40 ou les promoteurs de l'adénovirus. Des vecteurs type Baculovirus peuvent être aussi utilisés pour l'expression dans des cellules d'insectes.

Les cellules hôtes sont par exemple des cellules procaryotes ou des cellules eucaryotes. Les cellules procaryotes sont par exemple E. coli, Bacillus ou Streptomyces. Les cellules hôtes eucaryotes comprennent des levures ainsi que des cellules d'organismes supérieurs, par exemple des cellules de mammifères ou des cellules d'insectes. Les cellules de mammifères sont par exemple des fibroblastes tels que des cellules CHO ou BHK de hamster et des cellules Cos de singe. Les cellules d'insectes sont par exemple des cellules SF9.

La présente invention concerne donc un procédé qui comprend l'expression de la protéine hTFIIIA dans une cellule hôte transformée par un ADN codant pour la séquence

polypeptidique correspondant à la séquence SEQ ID N°2.

Pour la réalisation de la présente invention, les vecteurs utilisés peuvent être par exemple pGEX ou pBAD et la cellule hôte peut être *E. coli* ou par exemple le vecteur
5 pYX223 et la cellule hôte peut être également *S. cerevisiae*.

La présente invention a notamment pour objet une cellule hôte transformée avec un vecteur tel que défini ci-dessus contenant le gène *htfIIIA* selon la présente invention.

La présente invention a très précisément pour objet le
10 plasmide déposé à la CNCM sous le numéro I-2071.

Il s'agit ainsi de la souche XL1-Blue/pBShtfc2LHA renfermant le gène *htfIIIA* selon la présente invention.

Les conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention sont décrites ci-après dans la partie
15 expérimentale.

La protéine *HTFIIIA* codée par le gène *htfIIIA* est donc un facteur de régulation de la transcription. En effet, la protéine *HTFIIIA* codée par le gène de la présente invention a un rôle biologique comme protéine se liant à l'ADN et le
20 produit de ce gène est utile comme facteur de régulation de la transcription.

En particulier, le gène de la présente invention est exprimé dans différents tissus et joue probablement un rôle important dans l'initiation de la transcription du gène de l'ARN ribo-
25 somal 5S et dans le maintien de la stabilité de la transcription d'autres gènes impliqués notamment dans des fonctions de contrôle.

Un très grand nombre de maladies accompagnant un désordre dans le contrôle de la transcription ont récemment été mises
30 en évidence. Ainsi on a constaté que certains produits oncogènes agissent comme des facteurs de régulation de la transcription et peuvent conduire à une cancérisation de cellules comme par exemple dans certaines leucémies ou encore que la production en trop grande quantité du facteur de
35 régulation *Hox2-4* induit une leucémie chez la souris.

Par ailleurs, dans certaines maladies héréditaires, la protéine concernée peut être en elle-même normale, la pathogénicité résultant du mécanisme de transcription du gène

codant pour cette protéine. Notamment, de nombreuses maladies héréditaires montrent une anomalie de la quantité de protéines synthétisées ce qui est probablement dû à un désordre au niveau de la synthèse protéique pouvant notamment
5 mettre en jeu le gène htfIIIA et la protéine codée en tant que facteurs impliqués dans le contrôle de la transcription de l'ARN 5S.

Le gène de la présente invention peut ainsi être utilisé pour la recherche d'anomalies au niveau de la transcription
10 des gènes et notamment pour l'identification de maladies héréditaires ou pour l'étude de maladies mettant en cause les facteurs de régulation et notamment la protéine codée par htfIIIA.

Le gène de la présente invention peut également être
15 utilisé pour le traitement de certaines maladies à travers le contrôle de la transcription ou dans l'analyse de la pathogénie de ces maladies.

La présente invention prévoit donc une utilisation du gène htfIIIA de la présente invention et de la protéine
20 hTFIIIA de la présente invention, notamment pour contribuer à la compréhension du mécanisme de la transcription chez l'homme et pour contribuer également à la compréhension, au diagnostic et au traitement de maladies liées à un dérèglement du mécanisme de transcription. Ainsi htfIIIA et
25 la protéine hTFIIIA pourraient être utilisés dans le diagnostic ou l'identification de maladies héréditaires comme certains cancers ou d'autres maladies résultant d'un contrôle anormal de la transcription. Ces facteurs peuvent également être utiles dans l'analyse des mécanismes de régulation de la
30 transcription.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation de la séquence d'ADN du gène du facteur de transcription humain htfIIIA ou du polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription humain codé par ladite séquence d'ADN ainsi
35 qu'il est défini ci-dessus pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies liées à un désordre dans le contrôle de la transcription.

De telles compositions sont préparées dans les conditions usuelles connues de l'homme du métier.

La présente invention a plus précisément pour objet l'utilisation telle que définie ci-dessus pour laquelle la
5 maladie concernée est le cancer. Les figures 1 à 5 ci-après présentent les illustrations suivantes. La figure 1 représente la comparaison de la protéine hTFIIIA de la présente invention avec la protéine hTFIIIA de DREW. La figure 2 représente la comparaison de la protéine hTFIIIA
10 de la présente invention avec la protéine hTFIIIA de ARAKAWA. La figure 3 représente la comparaison de la protéine hTFIIIA de DREW avec la protéine hTFIIIA de ARAKAWA. La figure 4 représente la séquence htfIIIA de DREW et la protéine hTFIIIA correspondante.
15 La figure 5 représente la séquence htfIIIA de ARAKAWA et la protéine hTFIIIA correspondante.

Les séquences indiquées dans la présente invention soit : SEQ ID N°1 à SEQ ID N°10 sont décrites ci-après.

La partie expérimentale ci-après permet de décrire la
20 présente invention sans toutefois la limiter.

Partie expérimentale

Exemple 1 : clonage et séquençage du gène hTFIIIA

I) Extraction des ARN totaux provenant de la lignée cellulaire humaine RAJI (RNA Plus, BIOPROBE)

25 La lignée cellulaire humaine RAJI a été choisie comme source d'ARN totaux. Les cellules RAJI utilisées ont été cultivées dans les conditions usuelles de culture de cette lignée que connaît l'homme du métier.

Pour extraire les ARN totaux de ces cellules, on a procédé
30 selon un protocole usuel en utilisant la solution d'extraction commerciale RNA Plus ® (BIOPROBE SYSTEMS).

On a procédé de la manière suivante :

a) homogénéisation :

Les cellules cultivées en suspension sont sédimentées sans
35 être lavées au préalable pour éviter les risques de dégradation des ARNm puis sont lysées par addition de la solution d'extraction du kit RNA plus ® à raison de 6 ml pour 10⁷ cellules. Les échantillons obtenus d'homogénat peuvent

être stockés à - 70 °C.

b) extraction de l'ARN :

Après homogénéisation, on laisse l'homogénat obtenu en a) ci-dessus à 4°C pendant 5 minutes afin de permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. On ajoute ensuite 0.2 ml de chloroforme pour 1 ml de la solution de RNA Plus ® ajoutée ci-dessus en a), on agite vigoureusement pendant 15 secondes et on laisse reposer dans la glace pendant 5 minutes. On centrifuge, à 12000 g et à 4°C, pendant 10 15 minutes.

Il se forme alors deux phases bien visibles : l'ADN et les protéines sont retrouvés dans la phase organique (phase inférieure) et à l'interface. Les ARN sont dans la phase aqueuse (phase supérieure) qui représente environ 40 à 50 % du volume total.

c) Précipitation de l'ARN :

On transfère la phase aqueuse obtenue en b) dans un tube neuf, on ajoute un volume d'isopropanol, et on place l'échantillon, à 4°C pendant 15 minutes. On centrifuge 20 l'échantillon pendant 15 minutes à 4°C et 12000g. On obtient un précipité qui forme un culot blanc-jaunâtre au fond du tube.

d) Lavage de l'ARN :

On élimine le surnageant de la solution obtenue en c) puis on 25 lave le culot avec une solution d'éthanol à 75 % en utilisant au moins 0.8 ml d'éthanol pour 50 à 100 microgrammes d'ARN. On mélange (vortex), on centrifuge 10 minutes à 7500 g à 4°C et sèche sous vide. L'ARN obtenu est alors repris dans 60 microlitres de Tris 10 mM EDTA 1 mM pH=7,5.

30 II) Synthèse d'ADNc

a) Réactifs utilisés :

Le kit commercial Gene Amp® RNA PCR Kit (Perkin Elmer) a été utilisé pour cette synthèse d'ADNc. Par l'utilisation de ce kit, on obtient d'abord la réverse transcription de l'ARN en ADNc par la réverse transcriptase 35 MuLV (Murine Leukemia Virus). Un inhibiteur de la RNase isolée à partir de placenta humain est inclus afin d'inhiber certaines RNases de mammifères. Les fragments d'ADNc sont

amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).
L'enzyme utilisée pour cette réaction est la pfu polymerase (Stratagène).

L'expression dNTP désigne les nucléotides dGTP, dATP, dTTP et
5 dCTP.

L'expression PCR Buffer désigne la solution renfermant 500 mM
KCl et 100 mM HCl à pH 8.3.

L'expression Oligod(T)16 désigne une séquence nucléotidique
constituée de 16 nucléotides dTTP.

10 Des oligonucléotides sont utilisés comme amorces dans la
technique décrite ci-après.

Les concentrations indiquées ci-après représentent les
concentrations finales dans le milieu réactionnel.

b). Synthèse de l'ADNc par reverse transcription :

15 2 microlitres des ARN totaux (1 microgramme) obtenus ci-
dessus en 1)d) sont préincubés à 65°C pendant 5 minutes. On
ajoute ensuite 8 microlitres de la solution réactionnelle
suivante : 5mM MgCl₂, 1xPCR buffer, 1 mM de chaque dNTP, 5 %
de DMSO, 1 U/microlitre d'inhibiteur de RNase, 2.5 U/micro-
20 litre de reverse transcriptase MuLV, 2.5 microlitres de
oligo(dT)16. On incube alors à 42°C pendant une heure, puis à
99°C pendant 5 minutes puis à 5°C pendant 5 minutes.

III) Amplification par PCR, clonage et séquençage des
séquences nucléotidiques 3' et 5'

25 a) Conditions réactionnelles :

La bactérie Escherichia coli (E. coli) XL1- Blue type K12
(Stratagène) a été utilisée pour la préparation des plasmides
de la présente invention.

La croissance de cette bactérie a été effectuée selon les
30 conditions usuelles en milieu liquide LB qui renferme 10 g de
bactotryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl pour
un litre d'eau et qui renferme également 100 microg/ml
d'ampicilline (SIGMA).

La colonie a été prélevée sur milieu solide LB + agar +
35 ampicilline puis cultivée dans 100 ml de milieu LB et incubée
jusqu'à DO (600nm) = 0.8.

L'incubation a été effectuée à 37°C sous atmosphère normale
et agitation à 225 rpm.

La viabilité de la souche est vérifiée lorsque la souche pousse sur milieu LB + ampicilline à 100 microg/ml, l'insert renfermant un gène de résistance à l'ampicilline bla.

On peut noter qu'un gène de résistance à l'ampicilline bla fait partie du vecteur du kit (TA cloning Kit - Invitrogen) dans lequel sont clonés les fragments de htfIIIA. Ainsi, la sélection des souches renfermant les plasmides contenant le gène htfIIIA de la présente invention peut être opérée par la culture des souches dans ce milieu qui renfermant de l'ampicilline (100 microg/ml), un tel milieu permettant la survie uniquement des souches qui renferment le gène de résistance à l'ampicilline et ainsi uniquement des souches qui renferment le gène htfIIIA de la présente invention.

Pour la conservation des souches obtenues, 15 % de glycérol sont ajoutés au milieu de culture : les cultures sont donc conservées dans le milieu de suspension LB + 100 microgrammes/ml d'ampicilline + 15 % de glycérol à la concentration bactérienne de DO (600nm) = 0.8 sous forme d'aliquots en cryotubes de 1 ml par tube.

Pour le séquençage, l'ADN plasmidique de plusieurs bactéries issues de chacun des clonages indiqués ci-après est préparé en utilisant un kit commercial (Qiagen Plasmids kit). Les fragments correspondant à la séquence codante de htfIIIA sont séquencés sur les deux brins suivant les techniques classiques connues de l'homme du métier (utilisation du séquenceur ABI 377 XL, Perkin Elmer).

b) Amplification par PCR, et clonage des séquences nucléotidiques 3' et 5' :

1) Amplification et clonage de la séquence nucléotidique 3' Deux amorces d'amplification (primers) ont été choisies d'après la séquence publiée HTFIIIA de ARAKAWA. Ces amorces OLT3 ou TFIIIA3'SmaI et OLT5.2 sont nommées respectivement SEQ ID N°10 et SEQ ID N°6.

Ces oligonucléotides sont choisis dans la séquence HTFIIIA publiée de ARAKAWA (figure 5) et sont synthétisés selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier.

L'oligonucléotide TFIIIA3'SmaI introduit un site de restriction SmaI en aval de la séquence codante. Ce site

permettra la fusion de la séquence nucléotidique 3' de htfIIIA avec une séquence codant pour le peptide TAG hémagglutinine.

Ainsi, le peptide résultant de l'expression de la séquence
5 clonée comprendra donc à la fois la séquence de htfIIIA de la présente invention et celle du TAG HA et pourra ainsi être détecté en analyse par Western selon les techniques usuelles connues de l'homme du métier.

On procède de la façon suivante : 2 microlitres d'ADNc obtenu
10 ci-dessus en II) b) sont ajoutés à 50 microlitres de la solution réactionnelle suivante: 2mM MgCl₂, 1xPCR buffer, 200 nanogrammes/ml de chaque dNTP, les primers TFIIIA3'SMAI et OLT5.2 à raison de 0.15 micromoles/l pour chacun, 5 % de DMSO et 2.5 U AmpliTaq ADN polymérase.

15 L'ADNc est ainsi soumis à 30 cycles PCR d'abord à 94°C , pendant une minute puis à 65°C pendant 1 minute puis à 72°C pendant 1 minute.

Les produits amplifiés par PCR ainsi obtenus sont donc des fragments 3' d'environ 970 paires de bases.

20 Les fragments 3' obtenus ci-dessus sont clonés dans le vecteur pCRII en utilisant le TA cloning Kit (Invitrogen). Le plasmide ainsi obtenu est nommé 5.2 Raji 2.9. Ce plasmide est transféré dans la souche E. coli XL1 Blue. On obtient donc ainsi la souche E. coli transformée par le
25 plasmide 5.2 Raji 2.9.

2) Amplification et clonage de la séquence nucléotidique 5'
La portion 5' du gène htfIIIA de la présente invention a été isolée par la technique dite de PCR ancrée 5' en utilisant un kit commercial (5'RACE System, Rapid Amplification of ADNc
30 Ends, GIBCO BRL).

Deux amorces d'amplification (primers) ont été choisies dans la séquence publiée htfIIIA de ARAKAWA (cf. figure 5). Ces amorces TFIIIAPCR5' et TFIIIA SEQ2 sont nommées respectivement SEQ ID N°8 et SEQ ID N°7.

35 Une chaîne homopolymérique est ajoutée à l'extrémité 3' de l'ADNc en utilisant du dATP et la Terminal desoxynucléotidyl transférase (TdT): 10 microlitres d'ADNc obtenu ci-dessus en II) b) sont incubés à 37°C pendant 10 minutes dans la

solution réactionnelle 1 X tailing buffer (solution du Kit commercial) et 0.2 mM de dATP et TdT. La TdT est inactivée pendant 10 minutes à 65°C et la réaction est ensuite mise à 4°C.

- 5 La réaction est alors directement amplifiée par PCR : 10 microlitres de la réaction TdT sont ajoutés à 50 microlitres de solution réactionnelle PCR soit 1.5 mM de MgCl₂, 1xPCR buffer, 200 nanomoles/ml de chaque dNTP, les primers UAP et TFIIIA PCR5' à raison de 0.2 micromoles/l pour chacun, 5 % de DMSO et 2.5 U AmpliTaq ADN polymérase.

Le primer UAP est un oligonucléotide fourni avec le kit commercial.

- L'ADNc est ainsi soumis à 30 cycles PCR d'abord à 94°C pendant une minute, puis à 65°C pendant 1 minute puis à 72°C pendant 1 minute.

- Les produits amplifiés par cette première PCR soit PCR1 sont soumis à une seconde réaction d'amplification par PCR en utilisant le primer UAP et un primer spécifique TFIIIA SEQ 2. On procède de la façon suivante : 5 microlitres de PCR1 sont ajoutés à 50 microlitres de la solution réactionnelle de PCR indiquée ci-dessous (1.5 mM de MgCl₂, 1xPCR buffer, 200 micromoles/l de chaque dNTP, les primers UAP et TFIIIA SEQ2 à raison de 0.2 micromoles/l pour chacun, 5 % de DMSO et 2.5 U AmpliTaq ADN polymérase.

- 25 L'ADN est alors soumis à 30 cycles PCR d'abord à 94°C pendant une minute, puis à 65°C pendant 1 minute puis à 72°C pendant 1 minute.

- Les produits amplifiés par cette seconde PCR soit PCR2 sont purifiés sur gel d'agarose. Des fragments 5' d'environ 380 paires de bases sont ainsi isolés.

- Les fragments 5' obtenus ci-dessus sont alors clonés dans le vecteur pCRII en utilisant le TA cloning Kit (Invitrogen). Le plasmide ainsi obtenu est nommé ADNc-DMSO-3. Ce plasmide est transféré dans la souche E. coli XL1 Blue.
- 35 On obtient donc ainsi la souche E. coli transformée par le plasmide ADNc-DMSO-3.

3) Vérification de la séquence 5' par amplification d'ADN génomique - Construction du plasmide 5 geno-3

On extrait de l'ADN génomique humain à partir de cellules humaines de foie selon les méthodes usuelles connues de l'homme du métier.

On procède à une amplification par PCR de l'ADN génomique
5 humain de la façon suivante :

2 microgrammes d'ADN génomique humain obtenu comme indiqué ci-dessus sont ajoutés à 100 microlitres de la solution réactionnelle de PCR suivante : 2mM MgCl₂, 1 x native Pfu ADN polymerase buffer, 200 nanogrammes/ml de chaque dNTP, les
10 primers OLT5 et TFIIIA SEQ2 à raison de 0.15 micromoles/l pour chacun, 5 % de DMSO et 5 U pfu polymérase.
OLT5 et TFIIIA SEQ2 sont nommés respectivement SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7.

Le milieu réactionnel est ainsi soumis à 30 cycles PCR
15 d'abord à 94°C pendant une minute, puis à 60°C pendant 1 minute puis à 72°C pendant 1 minute.

Les produits amplifiés par PCR ainsi obtenus sont des fragments d'ADN d'environ 360 paires de bases.

Les fragments ainsi obtenus sont clonés dans le vecteur PCR-
20 Script en utilisant le PCR-Script SK(+) Cloning kit (Stratagène).

Le plasmide ainsi obtenu est nommé 5 geno-3.

Ce plasmide est transféré dans la souche E. coli XL1 Blue. On obtient donc ainsi la souche E. coli transformée par le
25 plasmide 5 geno-3.

4) Clonage du gène htfIIIA selon la présente invention -
Construction du plasmide pYX TFIIIALHA

On reconstitue la séquence codante htfIIIA complète par l'assemblage des deux fragments 3' et 5' obtenus ci-dessus en
30 III) b)1) et III) b)3)

Un site de restriction Hind III localisé sur chacun des fragments 3' et 5' obtenus ci-dessus permet de reconstituer la séquence complète.

Le plasmide 5 geno-3 obtenu ci-dessus en III) b)3) est digéré
35 par les enzymes de restriction EcoR1 et HindIII. Le site EcoR1 est situé à 11 nucléotides en amont de la séquence codante.

On obtient après purification sur gel d'agarose des fragments

d'environ 350 paires de bases.

On procède alors à la ligation avec le vecteur pYX/EcoRI + HindIII et obtient le vecteur pYXTFIIIA5'.

On procède ensuite à l'addition du fragment 3' sur le
5 fragment 5' : le plasmide 5.2 Raji 2.9 obtenu ci-dessus en III) b)1), est digéré par les enzymes de restriction HindIII et SmaI.

Après purification sur gel d'agarose, on obtient un fragment d'environ 930 paires de bases. Ce fragment est inséré dans le
10 plasmide pYXTFIIIA5' obtenu ci-dessus préalablement digéré par les enzymes de restriction SmaI et HindIII.

On obtient ainsi le plasmide pYXTFIIIALHA qui contient donc le gène htfIIIA de la présente invention.

Exemple 2 : Construction de la souche XL1 Blue/pYX TFIIIALHA

15 Pour la préparation de la souche XL1-Blue/ pYX TFIIIALHA, on procède selon les techniques connues de l'homme du métier (ref ci-dessus : Sambrook, Fritsh et Maniatis) à partir de la souche E. Coli XL1- Blue type K12 (Stratagène) et introduit le plasmide pYX TFIIIALHA obtenu ci-dessus à l'exemple 1.

20 **Exemple 3** : Construction du plasmide pBS-tfC2LHA

On utilise le vecteur pBS-SK+ (Stratagène) dans lequel on intègre un insert codant pour le gène htfIIIA de la présente invention. On procède comme suit : le plasmide pYXTFIIIALHA obtenu ci-dessus à l'exemple 1 est digéré par l'enzyme de
25 restriction EcoRI, cette extrémité est remplie à l'aide de l'ADN Polymerase (fragment de Klenow) et en présence de dNTP. Ce plasmide est ensuite digéré par Nhe I et le fragment correspondant à la séquence de htfIIIA selon la présente invention est purifié. Ce fragment est inséré dans le vecteur
30 pBS-SK+ préparé comme suit : le vecteur est digéré par EcoRI, ce site est rempli à l'aide de l'ADN polymérase puis digéré par XbaI.

On obtient ainsi le plasmide pBS-tfC2LHA.

Exemple 4 : Construction de la souche XL1-Blue/pBS-tfC2LHA

35 Pour la préparation de la souche XL1-Blue/pBS-tfC2LHA, on procède selon les techniques connues de l'homme du métier à partir de la souche E. Coli XL1- Blue type K12 (Stratagène) et introduit le plasmide pBS-tfC2LHA obtenu ci-dessus à

l'exemple 3.

Un échantillon de la souche obtenue soit E. Coli XL1- Blue type K12 (Stratagène) contenant le vecteur pBS-SK+ (Stratagène) avec un insert codant pour tfC2 (partie codante 5 ADNc contenant la région codante de htfIIIA) soit XL1- Blue/pBS-tfC2LHA a été déposé à l'Institut Pasteur 25, rue du Docteur ROUX Paris 75015 à la CNCM le 15 Septembre 1998 sous le numéro I-2071.

Exemple 5 : Identification du codon initiateur de la synthèse 10 protéique.

La purification de la protéine htfIIIA a été décrite par Moorefield et al (1994) [référence : the Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, N° 33, pp. 20857-20865, 1994, Purification and Characterization of Human Transcription 15 Factor IIIA, B. Moorefield and R. G. Roeder].

La protéine htfIIIA identifiée par Moorefield a un poids moléculaire de 42 kDa. On peut noter que le poids moléculaire théorique de la protéine htfIIIA codée par la séquence htfIIIA de ARAKAWA est de 47 kDa.

20 La synthèse protéique est généralement initiée au niveau d'un codon ATG. Cependant la séquence codante de htfIIIA de la présente invention ne contient pas de codon ATG en phase. Il a été démontré que des codons différents de ATG, en particulier les codons CTG ou GTG sont des codons d'initia- 25 tion de la traduction dans des transcrits cellulaires naturels.

Par des techniques connues de l'homme du métier telles que des expériences de traduction in vitro de la séquence htfIIIA selon la présente invention obtenue ci-dessus à l'exemple 1 30 et par des tests d'expression dans des cellules de mammifères comme des cellules Cos, le codon initiateur de la synthèse protéique de htfIIIA selon la présente invention a été mis en évidence.

Dans le cadre de la présente invention, il a ainsi été mis en 35 évidence que le codon initiateur de la synthèse protéique de htfIIIA selon la présente invention est le codon CTG qui se trouve à la position 176-178 de SEQ ID N°3.

Analyse des résultats

L'analyse des résultats obtenus par les préparations des exemples indiqués ci-dessus fait apparaître les points suivants relatifs à la séquence codante de htfIIIA :

- en 3' (ci-dessus en III) b)1)) l'essentiel de la séquence isolée dans la présente demande correspond à la séquence htfIIIA de DREW
- en 5' (ci-dessus en III) b)3)) la séquence la plus longue des fragments obtenus par la préparation décrite ci-dessus en III) b)3) débute en position 20 de la séquence htfIIIA de ARAKAWA et fait apparaître l'insertion d'un nucléotide en position 127 de la séquence htfIIIA de ARAKAWA.

Les résultats obtenus par les préparations décrites ci-dessus de htfIIIA selon la présente invention confirment qu'un nucléotide en position 127 omis dans la séquence de ARAKAWA existe bien dans le gène humain htfIIIA.

REVENDECATIONS

- 1) Séquence d'ADN du gène htFIIIA codant pour une protéine ayant la fonction biologique du facteur de transcription humain htFIIIA.
- 5 2) Séquence d'ADN du gène htFIIIA du facteur de transcription humain htFIIIA selon la revendication 1 codant pour la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2.
- 3) Séquence d'ADN du gène htFIIIA selon la revendication 1 ou 2 contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°3
- 10 4) Séquence d'ADN du gène htFIIIA selon les revendications 1 à 3 contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°4.
- 5) Séquence d'ADN selon la revendication 4 ayant la séquence commençant au nucléotide 176 et se terminant au nucléotide 1270 de SEQ ID N°3.
- 15 6) Séquence d'ADN codant pour le facteur de transcription humain htFIIIA selon les revendications 1 à 5 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent des homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci et qui codent pour une protéine ayant
- 20 la même fonction.
- 7) Séquence d'ADN selon les revendications 1 à 6 comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité biologique que le facteur de
- 25 transcription humain htFIIIA.
- 8) Séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7 ainsi que les séquences d'ADN similaires qui ont une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN.
- 30 9) Séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 8 ainsi que les séquences d'ADN similaires qui codent pour une protéine dont la séquence en AA a une homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec la séquence en AA
- 35 codée par ladite séquence d'ADN.
- 10) Polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription humain htFIIIA et ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°2 codée par la séquence d'ADN selon l'une des

- revendications 1 à 9 et les analogues de ce polypeptide.
- 11) Procédé de préparation de la protéine recombinante hTFIIIA ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2 comprenant l'expression de la séquence d'ADN selon l'une des
5 revendications 1 à 9 dans un hôte approprié puis l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante
- 12) Vecteur d'expression contenant la séquence d'ADN selon l'une des revendications 3 à 9.
- 13) Cellule hôte transformée avec un vecteur selon la
10 revendication 12
- 14) Plasmide déposé à la CNCM sous le numéro I-2071
- 15) Utilisation du gène du facteur de transcription humain htFIIIA ou du facteur de transcription humain codé par ce gène selon l'une des revendications 1 à 10 pour la
15 préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies liées à un désordre dans le contrôle de la transcription.
- 16) Utilisation selon la revendication 15 pour laquelle la maladie concernée est le cancer.

1/7

```
1 MDPPAVVAESVSSLTIADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFICSFPDCSAN 50
  |||||
1 ..PPAVVAESVSSLTIADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFICSFPDCSAN 48
  |||||
51 YSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHILHTHTGEKPF 100
  |||||
49 YSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHILHTHTGEKPF 98
  |||||
101 VCAATGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQQKQYICSFEDCKKTFKKHQQLK 150
  |||||
99 VCAANGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQQKQYICSFEDCKKTFKKHQQLK 148
  |||||
151 IHQCQHTNEPLFKCTQEGCGKHFA SP SKLKRHAKAHEGYVCQKGCSFVAK 200
  |||||
149 IHQCQHTNEPLFKCTQEGCGKHFA SP SKLKRHAKAHEGYVCQKGCSFVAK 198
  |||||
201 TWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPERDVCRCPR 250
  |||||
199 TWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPERDVCRCPR 248
  |||||
251 EGCGRYTTTFNLSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMQSLTRHAVV 300
  |||||
249 EGCGRYTTTFNLSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMQSLTRHAVV 298
  |||||
301 HDPDKKKMKLVKKSREKRSLASHLSGYIPPKRKQGQGLSLCQNGESPNC 350
  |||||
299 HDPDKKKMKLVKKSREKRSLASHLSGYIPPKRKQGQGLSLCQNGESPNC 348
  |||||
351 VEDKMLSTVAVLTLG 365
  |||||
349 VEDKMLSTVAVLTLG 363
```

FIGURE 1

```

1 .....MDPPAVVAESVSSLTIAADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFIC 42
:|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
51 PGLGGAGALDPPAVVAESVSSLTIAADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFIC 100

43 SFPDCSANYSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHL SRHIL 92
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
101 SFPDCSANYSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHL SRHIL 150

93 THTGEKPFVCAATGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQOKQYICS FEDCKKT 142
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
151 THTGEKPFVCAANGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQOKQYICS FEDCKKT 200

143 FKKHQQLKIHQCQHTNEPLFKCTQEGCGKHFASPSKLKRHAKAHEGYVCQ 192
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
201 FKKHQQLKIHQCQHTNEPLFKCTQEGCGKHFASPSKLKRHAKAHEGYVCQ 250

193 KGCSFVAKTWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPE 242
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
251 KGCSFVAKTWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPE 300

243 RDVCRCPREGCGRTYTTVFNLQSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQ 292
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
301 RDVCRCPREGCGRTYTTVFNLQSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQ 350

293 SLTRHAVVHDPDKKKMKLVKKSREKRS LASHLSGYIPPKRKQGGGLSLC 342
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
351 SLTRHAVVHDPDKKKMKLVKKSREKREFGLSSQWIYPPPKRKQGGGLSLC 400

343 QNGESPNCVEDKMLSTVAVLTLG 365
|||||||||||||||||||||
401 QNGESPNCVEDKMLSTVAVLTLG 423

```

FIGURE 2

3/7

```
51 PGLGGAGALDPPAVVAESVSSSLTIADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFIC 100
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1  .....PPAVVAESVSSSLTIADAFIAAGESSAPTPPRPALPRRFIC 40

101 SFPDCSANYSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHIL 150
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
41 SFPDCSANYSKAWKLD AHLCKHTGERPFVCDYEGCGKAFIRDYHLSRHIL 90

151 THTGEKPFVCAANGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQOKQYICSFEDCKKT 200
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
91 THTGEKPFVCAANGCDQKFNTKSNLKKHFERKHENQOKQYICSFEDCKKT 140

201 FKXHQQLKIHQCQNTNEPLFKCTQEGCGKHFFASPSKLKRHAKAHEGYVCQ 250
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
141 FKXHQQLKIHQCQHTNEPLFKCTQEGCGKHFFASPSKLKRHAKAHEGYVCQ 190

251 KGCSFVAKTWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPE 300
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
191 KGCSFVAKTWTELLKHVRETHKEEILCEVCRKTFKRKDYLKQHMKTHAPE 240

301 RDVCRCPREGCGRTYTTVFNLQSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQ 350
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
241 RDVCRCPREGCGRTYTTVFNLQSHILSFHEESRPFVCEHAGCGKTFAMKQ 290

351 SLTRHAVVHDPDKKKMKLVKKSREKREFGLSSQWIYPPKRKQGGGLSLC 400
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
291 SLTRHAVVHDPDKKKMKLVKKSREKRS LASHLSGYI PPKRKQGGGLSLC 340

401 QNGESPNCVEDKMLSTVAVLTLG 423
   ||||||||||||||||||||||||
341 QNGESPNCVEDKMLSTVAVLTLG 363
```

FIGURE 3

4/7

1	CCGCCGGCCGTGGTTCGCCGAGTCGGTGTCTCCTTGACCATCGCCGACGC	50
1	P P A V V A E S V S S L T I A D A	17
51	GTTTCATTGCAGCCGGCGAGAGCTCAGCTCCGACCCCGCCGCGCCCCGCGC	100
18	F I A A G E S S A P T P P R P A L	34
101	TTCCCAGGAGGTTTCATCTGCTCCTTCCCTGACTGCAGCGCCAATTACAGC	150
35	P R R F I C S F P D C S A N Y S	50
151	AAAGCCTGGAAGCTTGACGCGCACCTGTGCAAGCACACGGGGGAGAGACC	200
51	K A W K L D A H L C K H T G E R P	67
201	ATTTGTTTGTGACTATGAAGGGTGTGGCAAGGCCTTCATCAGGGACTACC	250
68	F V C D Y E G C G K A F I R D Y H	84
251	ATCTGAGCCGCCACATTCTGACTCACACAGGAGAAAAGCCGTTTGT	300
85	L S R H I L T H T G E K P F V C	100
301	GCAGCCAATGGCTGTGATCAAAAATTCAACACAAAATCAAACCTTGAAGAA	350
101	A A N G C D Q K F N T K S N L K K	117
351	ACATTTTGAACGCAAACATGAAAATCAACAAAAACAATATATATGCAGTT	400
118	H F E R K H E N Q Q K Q Y I C S F	134
401	TTGAAGACTGTAAGAAGACCTTTAAGAAACATCAGCAGCTGAAAATCCAT	450
135	E D C K K T F K K H Q Q L K I H	150
451	CAGTGCCAGCATACCAATGAACCTCTATTCAAGTGTACCCAGGAAGGATG	500
151	Q C Q H T N E P L F K C T Q E G C	167
501	TGGGAAACACTTTGCATCACCCAGCAAGCTGAAACGACATGCCAAGGCCC	550
168	G K H F A S P S K L K R H A K A H	184
551	ACGAGGGCTATGTATGTCAAAAAGGATGTTTCTTTGTGGCAAAAACATGG	600
185	E G Y V C Q K G C S F V A K T W	200
601	ACGGAACCTTCTGAAACATGTGAGAGAAACCCATAAAGAGGAAATACTATG	650
201	T E L L K H V R E T H K E E I L C	217

FIGURE 4

5/7

651	TGAAGTATGCCGAAAAACATTTAAACGCAAAGATTACCTTAAGCAACACA	700
218	E V C R K T F K R K D Y L K Q H M	234
701	TGAAAACATCATGCCCCAGAAAGGGATGTATGTCGCTGTCCAAGAGAAGGC	750
235	K T H A P E R D V C R C P R E G	250
751	TGTGGAAGAACCTATACAACTGTGTTTAATCTCCAAAGCCATATCCTCTC	800
251	C G R T Y T T V F N L Q S H I L S	267
801	CTTCCATGAGGAAAGCCGCCCTTTTGTGTGTGAACATGCTGGCTGTGGCA	850
268	F H E E S R P F V C E H A G C G K	284
851	AAACATTTGCAATGAAACAAAGTCTCACTAGGCATGCTGTTGTACATGAT	900
285	T F A M K Q S L T R H A V V H D	300
901	CCTGACAAGAAGAAAATGAAGCTCAAAGTCAAAAAATCTCGTGAAAAACG	950
301	P D K K K M K L K V K K S R E K R	317
951	GAGTTTGGCCTCTCATCTCAGTGGATATATCCCTCCCAAAGGAAACAAG	1000
318	S L A S H L S G Y I P P K R K Q G	334
1001	GGCAAGGCTTATCTTTGTGTCAAACGGAGAGTCACCCAACCTGTGTGGAA	1050
335	Q G L S L C Q N G E S P N C V E	350
1051	GACAAGATGCTCTCGACAGTTGCAGTACTTACCCTTGGCTAAGAACTGCA	1100
351	D K M L S T V A V L T L G *	364
1101	CTGCTTTGTTTAAAGGACTGCAGACCAAGGAGCGAGCTTTCTCTCAGAGC	1150
1151	ATGCTTTTCTTTATTAAAAATTAC	1173

FIGURE 4

6/7

1	ATGCGCGATCTCCCGGAGCATGCGCAGCAGCGGCGCCGACGCGGGGCGGT	50
1	M R S S G A D A G R C	11
51	GCCTGGTGACCGCGCGCGCTCCCGGAAGTGTGCCGGCGTCCGCGGAAGGT	100
12	L V T A R A P G S V P A S R E G	27
101	TCAGCAGGGAGCCGTGGGCCGGGCGCGCGGTTCCCGGCACGTGTCTCGGC	150
28	S A G S R G P G A R F P A R V S A	44
151	ACGTGGCAGCGCGCCTGGCCCTGGGCTTGGAGGCGCCGGCGCCCTGGATC	200
45	R G S A P G P G L G G A G A L D P	61
201	CGCCGGCCGTGGTCCGCCAGTCGGTGTCTGCTCCTTGACCATCGCCGACGCG	250
62	P A V V A E S V S S L T I A D A	77
251	TTCATTGCAGCCGGCGAGAGCTCAGCTCCGACCCCGCCGCGCCCGCGCT	300
78	F I A A G E S S A P T P P R P A L	94
301	TCCCAGGAGGTTTCATCTGCTCCTTCCCTGACTGCAGCGCCAATTACAGCA	350
95	P R R F I C S F P D C S A N Y S K	111
351	AAGCCTGGAAGCTTGACGCGCACCTGTGCAAGCACACGGGGGAGAGACCA	400
112	A W K L D A H L C K H T G E R P	127
401	TTTGTGTTGTGACTATGAAGGGTGTGGCAAGGCCTTCATCAGGGACTACCA	450
128	F V C D Y E G C G K A F I R D Y H	144
451	TCTGAGCCGCCACATTCTGACTCACACAGGAGAAAAGCCGTTTGTGTTGTG	500
145	L S R H I L T H T G E K P F V C A	161
501	CAGCCAATGGCTGTGATCAAAAATTCAACACAAAATCAAACCTTGAAGAAA	550
162	A N G C D Q K F N T K S N L K K	177
551	CATTTTGAACGCAAACATGAAAATCAACAAAAACAATATATATGCAGTTT	600
178	H F E R K H E N Q Q K Q Y I C S F	194
601	TGAAGACTGTAAGAAGACCTTTAAGAAACATCAGCAGCTGAAAATCCATC	650
195	E D C K K T F K K H Q Q L K I H Q	211
651	AGTGCCAGAATACCAATGAACCTCTATTCAAGTGTACCCAGGAAGGATGT	700
212	C Q N T N E P L F K C T Q E G C	227

FIGURE 5

7/7

701	GGGAAACACTTTGCATCACCCAGCAAGCTGAAACGACATGCCAAGGCCCA	750
228	G K H F A S P S K L K R H A K A H	244
751	CGAGGGCTATGTATGTCAAAAAGGATGTTCTTTGTGGCAAAAACATGGA	800
245	E G Y V C Q K G C S F V A K T W T	261
801	CGGAAGTTCTGAAACATGTGAGAGAAACCCATAAAGAGGAAATACTATGT	850
262	E L L K H V R E T H K E E I L C	277
851	GAAGTATGCCCGGAAAAACATTTAAACGCAAAGATTACCTTAAGCAACACAT	900
278	E V C R K T F K R K D Y L K Q H M	294
901	GAAAACTCATGCCCCAGAAAGGGATGTATGTGCTGTCCAAGAGAAGGCT	950
295	K T H A P E R D V C R C P R E G C	311
951	GTGGAAGAACCTATACAACCTGTGTTTAATCTCAAAGCCATATCCTCTCC	1000
312	G R T Y T T V F N L Q S H I L S	327
1001	TTCCATGAGGAAAGCCGCCCTTTTGTGTGTGAACATGCTGGCTGTGGCAA	1050
328	F H E E S R P F V C E H A G C G K	344
1051	AACATTTGCAATGAAACAAAGTCTCACTAGGCATGCTGTTGTACATGATC	1100
345	T F A M K Q S L T R H A V V H D P	361
1101	CTGACAAGAAGAAAATGAAGCTCAAAGTCAAAAAATCTCGTGAAAAACGG	1150
362	D K K K M K L K V K K S R E K R	377
1151	GAGTTTGGCCTCTCATCTCAGTGGATATATCCTCCCAAAGGAAACAAGG	1200
378	E F G L S S Q W I Y P P K R K Q G	394
1201	GCAAGGCTTATCTTTGTGTCAAAACGGAGAGTCACCCAACTGTGTGGAAG	1250
395	Q G L S L C Q N G E S P N C V E D	411
1251	ACAAGATGCTCTCGACAGTTGCAGTACTTACCCTTGGCTAAGAACTGCAC	1300
412	K M L S T V A V L T L G *	424
1301	TGCTTTGTTTAAAGGACTGCAGACCAAGGAGTCGAGCTTTCTCTCAGAGC	1350
ATGCTTTTCTTTATTAAATTAAGTACTGATGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		1399

FIGURE 5

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> Hoechst Marion Roussel

<120> Gène humain htFIIIA et la protéine codée htFIIIA.

<130> 9823seq

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1273

<212> ADN

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (176) .. (1270)

<400> 1

```

atgcgagca gcggcgccga cgcggggcgg tgcctggtga ccgcgcgcgc tcccgggaagt 60
gtgccggcgt cgcgcgaagg ttcagcaggg agccgtgggc cgggcgcgcc ggttcccggc 120
acgtgtctcg gcacgtggca gcgcgcctgg ccctgggctt ggaggcgccg gcgcc ctg 178
                                         Met
                                         1

gat ccg ccg gcc gtg gtc gcc gag tcg gtg tcg tcc ttg acc atc gcc 226
Asp Pro Pro Ala Val Val Ala Glu Ser Val Ser Ser Leu Thr Ile Ala
          5                      10                      15

gac gcg ttc att gca gcc ggc gag agc tca gct ccg acc ccg ccg cgc 274
Asp Ala Phe Ile Ala Ala Gly Glu Ser Ser Ala Pro Thr Pro Pro Arg
          20                      25                      30

ccc gcg ctt ccc agg agg ttc atc tgc tcc ttc cct gac tgc agc gcc 322
Pro Ala Leu Pro Arg Arg Phe Ile Cys Ser Phe Pro Asp Cys Ser Ala
          35                      40                      45

aat tac agc aaa gcc tgg aag ctt gac gcg cac ctg tgc aag cac acg 370
Asn Tyr Ser Lys Ala Trp Lys Leu Asp Ala His Leu Cys Lys His Thr
          50                      55                      60                      65

ggg gag aga cca ttt gtt tgt gac tat gaa ggg tgt ggc aag gcc ttc 418
Gly Glu Arg Pro Phe Val Cys Asp Tyr Glu Gly Cys Gly Lys Ala Phe
          70                      75                      80

atc agg gac tac cat ctg agc cgc cac att ctg act cac aca gga gaa 466
Ile Arg Asp Tyr His Leu Ser Arg His Ile Leu Thr His Thr Gly Glu
          85                      90                      95

aag ccg ttt gtt tgt gca gcc act ggc tgt gat caa aaa ttc aac aca 514
Lys Pro Phe Val Cys Ala Ala Thr Gly Cys Asp Gln Lys Phe Asn Thr
          100                      105                      110

```

aaa tca aac ttg aag aaa cat ttt gaa cgc aaa cat gaa aat caa caa	562
Lys Ser Asn Leu Lys Lys His Phe Glu Arg Lys His Glu Asn Gln Gln	
115 120 125	
aaa caa tat ata tgc agt ttt gaa gac tgt aag aag acc ttt aag aaa	610
Lys Gln Tyr Ile Cys Ser Phe Glu Asp Cys Lys Lys Thr Phe Lys Lys	
130 135 140 145	
cat cag cag ctg aaa atc cat cag tgc cag cat acc aat gaa cct cta	658
His Gln Gln Leu Lys Ile His Gln Cys Gln His Thr Asn Glu Pro Leu	
150 155 160	
ttc aag tgt acc cag gaa gga tgt ggg aaa cac ttt gca tca ccc agc	706
Phe Lys Cys Thr Gln Glu Gly Cys Gly Lys His Phe Ala Ser Pro Ser	
165 170 175	
aag ctg aaa cga cat gcc aag gcc cac gag ggc tat gta tgt caa aaa	754
Lys Leu Lys Arg His Ala Lys Ala His Glu Gly Tyr Val Cys Gln Lys	
180 185 190	
gga tgt tcc ttt gtg gca aaa aca tgg acg gaa ctt ctg aaa cat gtg	802
Gly Cys Ser Phe Val Ala Lys Thr Trp Thr Glu Leu Leu Lys His Val	
195 200 205	
aga gaa acc cat aaa gag gaa ata cta tgt gaa gta tgc cgg aaa aca	850
Arg Glu Thr His Lys Glu Glu Ile Leu Cys Glu Val Cys Arg Lys Thr	
210 215 220 225	
ttt aaa cgc aaa gat tac ctt aag caa cac atg aaa act cat gcc cca	898
Phe Lys Arg Lys Asp Tyr Leu Lys Gln His Met Lys Thr His Ala Pro	
230 235 240	
gaa agg gat gta tgt cgc tgt cca aga gaa ggc tgt gga aga acc tat	946
Glu Arg Asp Val Cys Arg Cys Pro Arg Glu Gly Cys Gly Arg Thr Tyr	
245 250 255	
act act gtg ttt aat ctc caa agc cat atc ctc tcc ttc cat gag gaa	994
Thr Thr Val Phe Asn Leu Gln Ser His Ile Leu Ser Phe His Glu Glu	
260 265 270	
agc cgc cct ttt gtg tgt gaa cat gct ggc tgt ggc aaa aca ttt gca	1042
Ser Arg Pro Phe Val Cys Glu His Ala Gly Cys Gly Lys Thr Phe Ala	
275 280 285	
atg aaa caa agt ctc act agg cat gct gtt gta cat gat cct gac aag	1090
Met Lys Gln Ser Leu Thr Arg His Ala Val Val His Asp Pro Asp Lys	
290 295 300 305	
aag aaa atg aag ctc aaa gtc aaa aaa tct cgt gaa aaa cgg agt ttg	1138
Lys Lys Met Lys Leu Lys Val Lys Lys Ser Arg Glu Lys Arg Ser Leu	
310 315 320	
gcc tct cat ctc agt gga tat atc cct ccc aaa agg aaa caa ggg caa	1186
Ala Ser His Leu Ser Gly Tyr Ile Pro Pro Lys Arg Lys Gln Gly Gln	
325 330 335	
ggc tta tct ttg tgt caa aac gga gag tca ccc aac tgt gtg gaa gac	1234
Gly Leu Ser Leu Cys Gln Asn Gly Glu Ser Pro Asn Cys Val Glu Asp	
340 345 350	
aag atg ctc tcg aca gtt gca gta ctt acc ctt ggc taa	1273
Lys Met Leu Ser Thr Val Ala Val Leu Thr Leu Gly	
355 360 365	

<210> 2
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 2
 Met Asp Pro Pro Ala Val Val Ala Glu Ser Val Ser Ser Leu Thr Ile
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Phe Ile Ala Ala Gly Glu Ser Ser Ala Pro Thr Pro Pro
 20 25 30
 Arg Pro Ala Leu Pro Arg Arg Phe Ile Cys Ser Phe Pro Asp Cys Ser
 35 40 45
 Ala Asn Tyr Ser Lys Ala Trp Lys Leu Asp Ala His Leu Cys Lys His
 50 55 60
 Thr Gly Glu Arg Pro Phe Val Cys Asp Tyr Glu Gly Cys Gly Lys Ala
 65 70 75 80
 Phe Ile Arg Asp Tyr His Leu Ser Arg His Ile Leu Thr His Thr Gly
 85 90 95
 Glu Lys Pro Phe Val Cys Ala Ala Thr Gly Cys Asp Gln Lys Phe Asn
 100 105 110
 Thr Lys Ser Asn Leu Lys Lys His Phe Glu Arg Lys His Glu Asn Gln
 115 120 125
 Gln Lys Gln Tyr Ile Cys Ser Phe Glu Asp Cys Lys Lys Thr Phe Lys
 130 135 140
 Lys His Gln Gln Leu Lys Ile His Gln Cys Gln His Thr Asn Glu Pro
 145 150 155 160
 Leu Phe Lys Cys Thr Gln Glu Gly Cys Gly Lys His Phe Ala Ser Pro
 165 170 175
 Ser Lys Leu Lys Arg His Ala Lys Ala His Glu Gly Tyr Val Cys Gln
 180 185 190
 Lys Gly Cys Ser Phe Val Ala Lys Thr Trp Thr Glu Leu Leu Lys His
 195 200 205
 Val Arg Glu Thr His Lys Glu Glu Ile Leu Cys Glu Val Cys Arg Lys
 210 215 220
 Thr Phe Lys Arg Lys Asp Tyr Leu Lys Gln His Met Lys Thr His Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Arg Asp Val Cys Arg Cys Pro Arg Glu Gly Cys Gly Arg Thr
 245 250 255
 Tyr Thr Thr Val Phe Asn Leu Gln Ser His Ile Leu Ser Phe His Glu
 260 265 270
 Glu Ser Arg Pro Phe Val Cys Glu His Ala Gly Cys Gly Lys Thr Phe
 275 280 285
 Ala Met Lys Gln Ser Leu Thr Arg His Ala Val Val His Asp Pro Asp
 290 295 300

Lys Lys Lys Met Lys Leu Lys Val Lys Lys Ser Arg Glu Lys Arg Ser
 305 310 315 320
 Leu Ala Ser His Leu Ser Gly Tyr Ile Pro Pro Lys Arg Lys Gln Gly
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Leu Cys Gln Asn Gly Glu Ser Pro Asn Cys Val Glu
 340 345 350
 Asp Lys Met Leu Ser Thr Val Ala Val Leu Thr Leu Gly
 355 360 365

<210> 3
 <211> 1273
 <212> ADN
 <213> Human

<400> 3
 atgcgcagca ggcggcgccga cgcggggcggtg cgcctgggtga ccgcgcgcgc tcccgggaagt 60
 gtgcccggcgt cgcgcgaagg ttcagcagggt agccgtgggc cgggcgcgcgc gggtcccgggc 120
 acgtgtctcg gcacgtggca gcgcgcctgg ccctggggctt ggaggcgccg gcgccttgga 180
 tccgcgggc gtggtcgccg agtcgggtgtc gtccttgacc atcgccgacg cgttcattgc 240
 agccggcgag agctcagctc cgaccccgcc gcgccccgcg cttcccaggga gggttcattcg 300
 ctccctccct gactgcagcg ccaattacag caaagcctgg aagcttgacg cgcacctgtg 360
 caagcacacg ggggagagac catttggttg tgactatgaa ggggtgtggca aggccttcatt 420
 cagggactac catctgagcc gccacattct gactcacaca ggagaaaagc cgtttggttg 480
 tgcagccact ggctgtgatc aaaaattcaa cacaaaatca aacttgaaga aacattttga 540
 acgcaaacat gaaaatcaac aaaaacaata tatatgcagt tttgaagact gtaagaagac 600
 ctttaagaaa catcagcagc tgaaaatcca tcagtgccag cataccaatg aacctctatt 660
 caagtgtacc caggaaggat gtgggaaaca ctttgcatca ccagcaagc tgaaacgaca 720
 tgccaaggcc cagcagggt atgtatgtca aaaaggatgt tcctttgtgg caaaaacatg 780
 gacggaactt ctgaaacatg tgagagaaac ccataaagag gaaatactat gtgaagtatg 840
 ccggaaaaca tttaaacgca aagattacct taagcaacac atgaaaactc atgccccaga 900
 aagggatgta tgtcgctgtc caagagaagg ctgtggaaga acctatacta ctgtgtttaa 960
 tctccaaagc catatcctct cttccatga ggaaagccgc cttttgtgt gtgaacatgc 1020
 tggctgtggc aaaacatttg caatgaaaca aagtctcact aggcattgtg ttgtacatga 1080
 tcttgacaag aagaaaatga agctcaaagt caaaaaatct cgtgaaaaac ggagtttggc 1140
 ctctcatctc agtggatata tccctcccaa aaggaaacaa gggcaaggct tatctttgtg 1200
 tcaaaacgga gagtcacca actgtgtgga agacaagatg ctctcgacag ttgcagtact 1260
 tacccttggc taa 1273

5

<210> 4
 <211> 1213
 <212> ADN
 <213> Human

<400> 4
 gtgcccggcgc cgcgcgaagg ttcagcaggg agccgtgggc cgggcgcgcc ggttcccggc 60
 acgtgtctcg gcacgtggca gcgcgcctgg ccctgggctt ggaggcgccg gcgccctgga 120
 tccgcgggcc gtggtcgccg agtcgggtgtc gtccctgacc atcgccgacg cgttcattgc 180
 agccggcgag agctcagctc cgacccccgcc gcgccccgcg cttcccagga ggttcattctg 240
 ctccctccct gactgcagcg ccaattacag caaagcctgg aagcttgacg cgcacctgtg 300
 caagcacacg ggggagagac catttgtttg tgactatgaa ggggtgtggca aggccttcat 360
 cagggactac catctgagcc gccacattct gactcacaca ggagaaaagc cgtttgtttg 420
 tgcagccact ggctgtgatc aaaaattcaa cacaaaatca aacttgaaga aacattttga 480
 acgcaaacat gaaaatcaac aaaaacaata tatatgcagt tttgaagact gtaagaagac 540
 ctttaagaaa catcagcagc tgaaaatcca tcagtgccag cataccaatg aacctctatt 600
 caagtgtacc caggaaggat gtgggaaaca ctttgcatca ccagcaagc tgaaacgaca 660
 tgccaaggcc cagcagggct atgtatgtca aaaaggatgt tcccttgtgg caaaaacatg 720
 gacggaactt ctgaaacatg tgagagaaac ccataaagag gaaatactat gtgaagtatg 780
 ccggaaaaca tttaaacgca aagattacct taagcaacac atgaaaactc atgccccaga 840
 aagggatgta tgtcgctgtc caagagaagg ctgtggaaga acctatacta ctgtgtttta 900
 tctccaaagc catatcctct ccttccatga ggaaagccgc ccttttgtgt gtgaacatgc 960
 tggctgtggc aaaacatttg caatgaaaca aagtctcact aggcattgctg ttgtacatga 1020
 tcctgacaag aagaaaatga agctcaaagt caaaaaatct cgtgaaaaac ggagtttggc 1080
 ctctcatctc agtggatata tccctcccaa aaggaaacaa gggcaaggct tatctttgtg 1140
 tcaaaacgga gagtcacca actgtgtgga agacaagatg ctctcgacag ttgcagtact 1200
 tacccttggc taa 1213

<210> 5
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Human

<400> 5
 cggggtacca aaaatgcgca gcagcggcgc cgac

34

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Human

<400> 6
tccttccctg actgcagcgc c 21

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Human

<400> 7
tgcacaggtg cgcgtcaagc 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Human

<400> 8
cacaaacaaa tggctctctcc 20

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Human

<400> 9
cggctctagat tagccaaggg taagtactgc 30

<210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Human

<400> 10
cctcccgggg ccaagggtaa gtactgcaac 30